



seit 1558

Stressantworten und p53-vermittelte Apoptose nach Chemotherapie

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

Christian Marx

Master of Science (M.Sc.) Biochemie und Molekulare Biologie

Bachelor of Science (B.Sc.) Biochemie

Geboren am 13.04.1986 in Lichtenfels

Datum der Verteidigung

17. Februar 2017

Gutachter der Arbeit

Prof. Dr. Oliver Krämer

Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz, Mainz, Deutschland

Prof. Dr. Martin Michaelis

School of Biosciences, University of Kent, Canterbury, Großbritannien

Prof. Dr. Frank Große

Leibniz Institut für Alternsforschung – Fritz Lipmann Institut (FLI), Jena, Deutschland

PD Dr. Carsten Weiss

Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, Deutschland

Die Feder kritzelt

Die Feder kritzelt: Hölle das!
Bin ich verdammt zum Kritzeln-Müssen? –
So greif ich kühn zum Tintenfaß
Und schreib mit dicken Tintenflüssen.
Wie läuft das hin, so voll, so breit!
Wie glückt mir alles, wie ichs treibe!
Zwar fehlt der Schrift die Deutlichkeit –
Was tuts? Wer liest denn, was ich schreibe?

Friedrich Nietzsche, *Die fröhliche Wissenschaft*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 Mitochondrien: Energiequelle und Todesboten	5
3.1.1 Aufbau von Mitochondrien	5
3.1.2 Mitochondrien als Knotenpunkte des zellulären Stoffwechsels	7
3.1.3 Der intrinsische Apoptose-Weg	10
3.2 Regulation wichtiger mitochondrialer Funktionen durch p53	13
3.2.1 Aktivierung und Stabilisierung von p53 durch post-translationale Modifikationen	13
3.2.2 Induktion der intrinsischen Apoptose durch p53	18
3.2.3 P53-abhängige Regulation des Stoffwechsels	19
3.3 Zielsetzung	20
4 Material und Methoden	22
4.1 Material	22
4.1.1 Chemikalien	22
4.1.2 Kits, Lösungen und TaqMan®-Sonden	24
4.1.3 Antikörper	24
4.1.4 Zelllinien	25
4.1.5 Medien und Zellkulturbedarf	25
4.1.6 Plasmide	26
4.1.7 Puffer und Lösungen	26
4.2 Methoden	29
4.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien	29
4.2.2 Behandlung der Zellen	30
4.2.3 Transfektion humaner Zellen	30
4.2.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten	31
4.2.5 Isolation von Mitochondrien aus adhärenenten Zellen	31
4.2.6 Mitochondriale Fraktionierung durch Natriumcarbonat-Behandlung	32
4.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford	32
4.2.8 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
4.2.9 Western Blot und Immundetektion von Zielproteinen	33
4.2.10 Quantitative <i>real-time polymerase chain reaction</i>	34
4.2.11 Durchflussszytometrie	34
4.2.12 MTT-Test mit paralleler Zellzahlbestimmung	36
4.2.13 Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs	36

4.2.14 Massenspektroskopie	37
4.1.15 Elektronenmikroskopie	39
5 Ergebnisse	41
5.1 p53-abhängige Induktion des mitochondrialen Apoptose-Weges	41
5.1.1 Die Kombination aus Irinotecan und Entinostat führte zu p53-abhängigem Zelltod und Apoptose-Induktion in HCT116 Zellen	41
5.1.2 Der mitochondriale Apoptose-Weg wurde in HCT116 p53wt Zellen durch Caspasen initiiert	44
5.1.3 Durch Entinostat sank die Transkription von p53-Zielgenen	47
5.1.4 Acetyliertes p53 lokalisierte an den Mitochondrien nach genotoxischem Stress	49
5.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies akkumulierten in HCT116 Zellen als Folge von genotoxischem Stress	52
5.1.6 Durch Elektronenmikroskopie wurden mitochondriale Schäden und morphologische Änderungen sichtbar	54
5.1.7 P53 wurde stark C-terminal acetyliert nach der kombinierten Behandlung aus Irinotecan und Entinostat	57
5.1.8 C-terminal mutiertes p53 war nicht mehr in der Lage mitochondriale Apoptose zu induzieren	61
5.2 P53-unabhängige Änderungen des zellulären Metabolismus nach DNA-Schäden	64
5.2.1 MTT-Tests und die Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs zeigten eine p53-unabhängige Steigerung des Metabolismus	64
5.2.2 Irinotecan reduzierte die mRNA-Expression mitochondrialer Gene	68
5.2.3 Verschiedene Inhibitoren waren in der Lage den Metabolismus zu beeinflussen	69
5.2.4 Mehrere DNA-schädigende Chemotherapeutika waren in der Lage den Sauerstoffverbrauch zu steigern	71
5.2.5 Die Behandlung mit Irinotecan induzierte globale Änderungen des zellulären Metabolismus	72
5.2.6 Geringere Glukoseverfügbarkeit verstärkte den toxischen Effekt von Irinotecan	75
6 Diskussion	78
6.1 Die C-terminale Acetylierung von p53 beeinflusste das Ausmaß der Apoptose nach genotoxischem Stress	78
6.2 Irinotecan löste reaktive Sauerstoffspezies und mitochondriale Schäden aus	88
6.3 DNA-Schäden lösten globale Änderungen des Zellstoffwechsels aus	92
6.4 Eigene Publikationen im Zusammenhang mit dieser Dissertation	97
6.5 Schlussfolgerung	102
7 Literaturverzeichnis	104
8 Anhang	125
Lebenslauf mit Liste der Veröffentlichungen	VIII
Danksagung	XI
Selbstständigkeitserklärung	XIII

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 3.1: Aufbau des zirkulären mitochondrialen Genoms
- Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Atmungskette
- Abbildung 3.3: Aufbau verschiedener Proteine der BCL-2-Familie
- Abbildung 3.4: Aufbau von p53 und Häufigkeit von Mutationen des Proteins
- Abbildung 3.5: Veränderungen der Lokalisation von p53 oder proteasomaler Abbau durch Ubiquitinierungen
- Abbildung 3.6: Ausgewählte Acetylierungsstellen in p53 und die zugehörigen Histonacetyltransferasen (HATs)
- Abbildung 3.7: Interaktion von p53 an Mitochondrien
- Abbildung 5.1: Die Kombination aus Irinotecan und Entinostat führt zu einer deutlichen Apoptose-Induktion in HCT116 p53wt Zellen
- Abbildung 5.2: Auch auf Proteinebene zeigen HCT116 p53wt Zellen stärkere Anzeichen von Apoptose nach kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat
- Abbildung 5.3: z-VAD-FMK in Kombination mit Irinotecan und Entinostat schützt vor dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials
- Abbildung 5.4: Die relative mRNA-Expression von p53-regulierten Genen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat zeigt Unterschiede zwischen den HCT116 Zelllinien
- Abbildung 5.5: Sub-zelluläre Fraktionierungen zeigen, dass p53 nach kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat sowohl an der mitochondrialen Membran, als auch in der mitochondrialen Matrix zu finden ist
- Abbildung 5.6: Gesteigerte Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies treten nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat in HCT116 Zellen auf
- Abbildung 5.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat deuten auf mitochondriale Schäden hin
- Abbildung 5.8: Erhöhte Autophagie tritt in HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan auf
- Abbildung 5.9: P53 wird an mehreren Positionen stark post-translational modifiziert nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat
- Abbildung 5.10: Durch Massenspektroskopie wird ebenfalls gezeigt, dass p53 nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat stark post-translational modifiziert wird
- Abbildung 5.11: Die C-terminale p53 6KR Mutante induziert signifikant weniger Apoptose als p53wt nach kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat
- Abbildung 5.12: Der MTT-Umsatz in HCT116 Zellen wird durch die Irinotecan-Behandlung gesteigert

- Abbildung 5.13: Der Sauerstoffverbrauch von HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat ist deutlich gesteigert
- Abbildung 5.14: Die relative mRNA-Expression mitochondrialer Gene nach Irinotecan Behandlung ist niedriger als in unbehandelten Zellen
- Abbildung 5.15: Verschiedene mitochondriale Inhibitoren senken den zellulären Sauerstoffverbrauch
- Abbildung 5.16: Mehrere Chemotherapeutika steigern den zellulären Sauerstoffverbrauch in HCT116 und K562 Zellen
- Abbildung 5.17: Der Nährstoffverbrauch und die -nutzung sind nach Irinotecan-Behandlung verändert
- Abbildung 5.18: Niedrige der Glukoseverfügbarkeit während der Behandlung mit Irinotecan steigert die Toxizität
- Abbildung A.1: Kurze Behandlungszeiten mit Irinotecan und Entinostat in HCT116 Zellen
- Abbildung A.2: Dosis-Wirkungskurven von Irinotecan kombiniert mit Entinostat in HCT116 Zellen
- Tabelle A.1: Berechnung der *CI*-Werte nach kombinierter Behandlung aus Irinotecan (CPT-11) und Entinostat (MS-275)
- Abbildung A.3: Vergleich der Effekte von Ethidiumbromid und Irinotecan
- Abbildung A.4: Aktivierung von BIM und p53 nach Irinotecan und Entinostat Behandlung
- Abbildung A.5: Lokalisation der C-terminalen p53-Mutante im Vergleich zum Wildtyp
- Abbildung A.6: Sauerstoffverbrauch nach kurzen Behandlungszeiten mit Irinotecan
- Abbildung A.7: ATM-Inhibitor KU55933 in Kombination mit Irinotecan
- Abbildung A.8: Veränderung intrazellulärer Stoffwechselzwischenprodukte nach Irinotecan Behandlung
- Abbildung A.9: Veränderte Sekretion von Metaboliten nach Irinotecan-Behandlung
- Abbildung A.10: Gesteigerte Aufnahme verschiedener Nährstoffe nach Irinotecan-Behandlung
- Abbildung A.11: Sauerstoffverbrauch nach unterschiedlicher Glukoseverfügbarkeit
- Abbildung A.12: Rolle der Glukoseverfügbarkeit während der Behandlung mit Irinotecan und Entinostat

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
$\Delta\Psi_M$	mitochondriales Membranpotential
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activation factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BAK	<i>BCL-2-antagonistic killer</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XI	<i>BCL-2 like protein 1</i> bzw. BCL2L1
BID	<i>BH3 interacting domain death antagonist</i>
BIM	<i>Bcl-2-like protein 11</i> bzw. BCL2L11
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
COX	Untereinheit der Cytochrom c-Oxidase
CPT-11	Irinotecan
Ctl	Kontrolle bzw. Kontrollbehandlung
Cyt c	Cytochrom c
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DH	Dehydrogenase
DiOC ₆ (3)	3'3-Dihexyloxacarcocyaniniodid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration

EtBr	Ethidiumbromid
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> bzw. <i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FAD/FADH ₂	oxidiertes bzw. reduziertes Flavinadenindinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i>
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT	<i>glucose transporter</i>
GSH/GSSG	oxidiertes bzw. reduziertes Glutathion
H2AX	Histon H2AX
H ⁺	Proton
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HRP	<i>horserdish peroxidase</i>
HSP90	<i>heat-shock protein 90</i>
HU	Hydroxyurea
IMS	<i>inter membrane space</i>
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilodalton
MCL-1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MDM2	<i>murine double minute 2 homolog</i>
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MS-275	Entinostat
mSin3A	<i>mammalian SIN3A</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD ⁺ /NADH	oxidiertes bzw. reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
Nf-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
O ₂	Sauerstoff
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p53wt	wildtypisches p53
p53 ^{-/-}	p53 Deletion
p53 6KR	p53-Mutante der alle sechs C-terminalen Lysine durch Arginine ersetzt wurden
p53 6KQ	p53-Mutante der alle sechs C-terminalen Lysine durch Glutamine ersetzt wurden
p53 8KR	wie p53 6KR, zusätzlich wurden die beiden Lysine der DBD durch Arginine ersetzt
<i>p</i> -Wert	<i>probability value</i>
PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1

PBS-T	PBS mit 0,05% Tween-20
PCAF	<i>P300/CBP-associated factor</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI	Propidiumiodid
PIC	Proteaseinhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PPW	Pentosephosphatweg
PTM	post-translationale Modifikation
PTP	<i>permeability transition pore</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Q/QH ₂	oxidiertes bzw. reduziertes Ubichinon/ Coenzym Q
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SAHA	<i>suberanilohydroxamic acid</i> (Vorinostat)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIRT	Sirtuin
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TET	Tetramerisierungsdomäne
TIGAR	<i>TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>
TIM	<i>translocator of the inner membrane</i>
TM	Transmembrandomäne
TOM	<i>translocator of the outer membrane</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TTFA	2-thenoyltrifluoroaceton
UE	Untereinheit
VPA	Valproinsäure
zVAD	N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me)-fluormethylketon (z-VAD-FMK)

Zusammenfassung

Mitochondrien sind das Zentrum verschiedener Stoffwechselwege, gleichzeitig aber auch der Ausgangspunkt des intrinsischen Apoptose-Wegs. Immer mehr deutet darauf hin, dass Anpassungen des Metabolismus an genotoxischen Stress Tumorzellen vor weiteren Schäden schützen können und die Apoptose in diesen reduzieren kann. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist zwar vor Allem für seine transkriptionelle Regulation des Zellzykluses, von DNA-Reparaturprozessen und der Apoptose bekannt, kann daneben aber auch die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, den Stoffwechsel, die Autophagie und durch direkte Proteininteraktionen an Mitochondrien, den intrinsischen Apoptose-Weg regulieren. Post-translationale Modifikationen verändern die Stabilität, Aktivität und Spezifität von p53 und damit dessen Signalwege.

Diese Arbeit war mit dem Ziel gestartet worden, p53-abhängige Veränderungen des Metabolismus und der Apoptose nach DNA-schädigender Chemotherapie zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei Genotypen, p53wt und p53-/-, der humanen Darmkrebszelllinie HCT116 als Testsystem verwendet. Diese wurden mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan (CPT-11) und dem Klasse I Histondeacetylaseinhibitor (HDACi) Entinostat (MS-275) für bis zu 48 h behandelt. MS-275 sollte die Acetylierung von p53 steigern und damit dessen Aktivität und Funktionen.

CPT-11 löste DNA-Schäden und eine Steigerung des gesamten Metabolismus in beiden HCT116 Zelllinien aus. Weitere DNA-schädigende Chemotherapeutika waren, wie CPT-11 in der Lage, den Sauerstoffverbrauch zu steigern. Interessanterweise waren die Veränderungen des Stoffwechsels p53-unabhängig und der HDACi hatte darauf keinen Einfluss. Alleine der DNA-Schaden schien dafür verantwortlich zu sein. Über ATM wurde vermutlich Seneszenz in den Zellen ausgelöst und damit die Aktivität der Atmungskette, der Glykolyse, des Zitratzykluses und daran anschließenden Stoffwechselwege gesteigert. Dabei war die mRNA-Expression mitochondrialer Gene nicht für die beobachteten Effekte verantwortlich. Durch den ATM-Inhibitor KU55933, die Atmungsketteninhibitoren Rotenon und TTFA und Chloramphenicol, konnten die Veränderung des Metabolismus durch CPT-11 deutlich reduziert werden.

Neben den p53-unabhängigen Effekten wurde der intrinsische Apoptose-Weg, abhängig von p53 und dessen Acetylierungsstatus induziert. Durch CPT-11 wurde p53 mehrfach post-translational modifiziert und aktiviert. Die Kombination mit MS-275 erhöhte die Acetylierung von p53, allerdings nur an dessen C-Terminus. Gleichzeitig zeigten HCT116 p53wt Zellen nach der kombinierten Behandlung mit CPT-11 und MS-275, einen höheren Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, mehr mitochondriale Schäden und erhöhte Anzeichen, dass der intrinsische Apoptose-Weg ausgelöst wurde, als nach den jeweiligen Einzelbehandlungen. Zusätzlich wurde durch die Kombination die Menge an acetyliertem p53 an Mitochondrien gesteigert. Die HCT116 p53^{-/-} Zellen wurden durch keine der Behandlungen deutlich geschädigt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass eine C-terminale Lysine-zu-Arginin p53 6KR-Mutante die Fähigkeit verlor die Zellvitalität zu senken, obwohl die Proteinmenge der Mutante durch den genotoxischen Stress weiterhin gesteigert wurde und p53 6KR an Mitochondrien lokalisiert war. Daher schien die gesteigerte C-terminale Acetylierung von p53 die mitochondriale Apoptose auszulösen oder zumindest zu beeinflussen. In den HCT116 p53wt Zellen wurde durch CPT-11 alleine außerdem die p21-Proteinmenge und Autophagie stark gesteigert. Beides sind Anzeichen von Reparaturprozessen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen und die Art der p53 Signalwege durch die veränderten post-translationalen Modifikationen entschieden über das Schicksal der Zellen. Der gesteigerte Metabolismus schützte beide HCT116 Zelllinien zusätzlich vor den Folgen der DNA-Schäden, denn durch niedrigere Glukose-Spiegel im Medium konnten HCT116 p53wt deutlich gegenüber der Behandlung mit CPT-11 sensibilisiert werden.

Daher ergaben sich zwei Möglichkeiten, die Wirkung von Irinotecan zu steigern. Einerseits durch Veränderungen von p53-Signalwegen über dessen C-terminale Acetylierung und andererseits über eine Verringerung der Nährstoffversorgung.

Summary

Mitochondria are the center of several metabolic pathways, but at the same time, they initiate the intrinsic apoptosis pathway. Increasing evidence suggest that metabolic alterations due to genotoxic stress protect tumour cells from further damages and lower the rate of apoptosis. The tumoursuppressor protein p53 is mainly known for its transcriptional regulation of the cell cycle, DNA-repair processes and apoptosis, but p53 is also able to regulate the intracellular levels of reactive oxygen species, autophagy and, via direct protein-interactions at mitochondria, the intrinsic apoptosis pathway. In this study we focused on metabolic adaptations and cell vitality changes related to p53 signaling and its post-translational modifications (PTMs) after genotoxic stress. Therefore, two genotypes of HCT116 colon carcinoma cells, a p53wt and a p53^{-/-} variant, were treated with the topoisomerase-I inhibitor irinotecan (CPT-11) and the class I histonedeacetylase inhibitor (HDACi) entinostat (MS-275). The treatment with MS-275 should increase the acetylation of p53 and thereby change its activity and function.

CPT-11 induced DNA-damages and increased the whole cellular metabolism in both HCT116 cell lines in a p53-independent manner. Like CPT-11, several other DNA-damaging chemotherapeutics enhanced the oxygen consumption. The HDACi had no effect on these metabolic adaptations and only the induced DNA-damage by CPT-11 seemed to be the cause. Activated ATM probably induced senescence in these cells and thereby elevated the activity of the electron transfer chain (ETC), tricarboxylic acid (TCA) cycle and related metabolic pathways, whereas the mRNA-expression of mitochondrial encoded genes was not involved. The ATM inhibitor KU55933, the ETC inhibitors rotenone and TTFA as well as chloramphenicol were able to reduce the metabolic alterations after CPT-11 treatment.

Besides these p53-independent effects, we observed p53-dependent changes of the intrinsic apoptosis pathway related to PTMs of p53. Irinotecan induced post-translation modification of p53 at several residues alongside with a strong induction of p53. As expected, MS-275 elevated the acetylation of p53 in combination with CPT-11. Unexpectedly, only the acetylation of C-terminal lysine residues was increased. Parallel to this observation, we found that HCT116 p53wt cells showed high levels of mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), mitochondrial damages as well as increased cell death and caspase-cleavage in

response to the combined treatment of CPT-11 and MS-275. Additionally, increased levels of acetylated p53 were localized to mitochondria after the combined treatment. HCT116 p53^{-/-} cells were merely affected by all treatments. Finally, we could show that a C-terminal lysine-to-arginine p53 6KR mutant lost its ability to decrease cell vitality after combined treatment of CPT-11 and MS-275, although p53 6KR was still induced and localized to mitochondria. Consequently, the treatment with CPT-11 and MS-275 increased p53s' C-terminal acetylation and initiated, or at least influenced, the mitochondrial apoptosis. The treatment with CPT-11 alone seemed to activate different p53 signaling pathways. In HCT116 p53^{wt} cells, CPT-11 strongly induced autophagy and increased p21 protein-levels, which are both signs for cellular repair processes. These differences between each treatment and in p53 signaling related to its C-terminal acetylation, decided about apoptosis induction or not. Although the activated metabolism probably protected the HCT116 cells from DNA-damaging chemotherapy, HCT116 p53^{wt} cells could still be sensitized to CPT-11 single-treatment by lowering glucose levels within the media.

Thus, two possibilities to increase the effectiveness of CPT-11 came from these observations. On the one hand, to change p53 signaling via its PTMs and on the other hand, to lower the nutrient supply of cancer cells.

3 Einleitung

Die Bekämpfung von Krebs ist heutzutage eine der wichtigsten Aufgaben der Wissenschaft. Da die klassische Tumorthherapie teilweise an ihre Grenzen stößt werden Wege gesucht, Resistenzen zu umgehen und die Effizienz der Chemotherapie zu steigern. Der zelluläre Metabolismus und p53-vermittelte Signalwege sind vielversprechende Ansatzpunkte um dies zu erreichen.

3.1 Mitochondrien: Energiequelle und Todesboten

Mitochondrien sind unbestritten die wichtigste ATP-Quelle in normalem Gewebe (Mammucari und Rizzuto, 2010). Mehrere Stoffwechselwege überschneiden sich in ihnen und liefern neben den nötigen Reduktionsäquivalenten (Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavinadenindinukleotid (FADH₂)) für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) auch wichtige Bausteine für Biosynthesen. Im Gegensatz dazu sind Mitochondrien aber auch der Ausgangspunkt der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose und Teil der extrinsischen, Liganden-vermittelten Apoptose und lösen damit den programmierten Zelltod aus (Guja und Garcia-Diaz, 2011; Letai, 2008; McBride *et al.*, 2006; Attardi und Schatz, 1988).

3.1.1 Aufbau von Mitochondrien

Nach der Endosymbiontentheorie wurden Mitochondrien ursprünglich als aerobe Bakterien von Vorläufern der eukaryotischen Zellen aufgenommen. Dafür spricht das eigene Genom der Mitochondrien, sowie deren eigene Proteinsynthesemaschinerie und DNA-Replikation. Außerdem vermehren und vernetzen sich Mitochondrien, unabhängig von den umgebenden eukaryotischen Zellen durch Teilung und Fusion mit anderen Mitochondrien (Sagan, 1967; Martin und Russell, 2003; Martinou und Youle, 2011).

Mitochondrien haben zwei Membranen, eine äußere, dem Zytosol zugewandte Membran und eine innere, der Matrix zugewandte Membran. In der äußeren Membran sind unter Anderem Kanäle und Transporter, sowie die Proteine der BCL-2-Familie verankert. An der inneren Membran sind verschiedene Enzyme befestigt, darunter die fünf Multienzymkomplexe der Atmungskette. Die innere Membran ist mehrfach eingestülpt um deren Oberfläche, und damit die Zahl der gebundenen Enzyme, zu erhöhen. Diese Invaginationen werden *Cristae* genannt und sind wichtig für die Funktionalität der OXPHOS (Manelle, 2006; Cogliati *et al.*, 2013). Zwischen



Das humane mitochondriale Genom enthält die Gene für Cytochrom *b* (*Cyt b*), Kernuntereinheiten der NADH-Dehydrogenase (*ND1-6*), Kernuntereinheiten der Cytochrom *c*-Oxidase (*COI, II* und *III*) und Untereinheiten der ATPase (*ATP8* und *6*) sowie die 16S und 12S ribosomalen Untereinheiten (*16S* und *12S*). Die Transkription startet im Bereich des D-loops in beide Richtungen und führt zu unterschiedlichen mtRNA-Transkripten. Abbildung modifiziert nach Guja und Garcia-Diaz, 2011.

6

die Funktionalität der Organelle zu gewährleisten (Pesole *et al.*, 2012; Heo und Rutter, 2011). Fehler führen zu missgefalteten Proteinen in Mitochondrien und deren Abbau durch mitochondriale Proteasen (Käser und Langer, 2000; Heo und Rutter, 2011; Koppen und Langer, 2007). Inhibitoren der eukaryotischen Proteinsynthese können diese Interaktionen stören und Mitochondrien schädigen (Wagner *et al.*, 2008). Geschädigte und fragmentierte Mitochondrien sind sensibler gegenüber der Insertion und Oligomerisierung von BAX und sind damit empfindlicher gegenüber Chemotherapien (Brooks *et al.*, 2010). Mitochondriale Schäden stehen auch in Zusammenhang mit Alterungsprozessen, angeborenen Krankheiten und gesteigerten Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS). Dabei sind Mitochondrien die Hauptquelle, aber auch eines der ersten Ziele von ROS. Schäden der mitochondrialen DNA (mtDNA), beispielsweise durch ROS, beeinflussen die OXPHOS und das Energieniveau der Zelle. Eine verschlechterte mitochondriale Funktion wird als ein Grund für Krankheiten wie Diabetes Typ 2, Krebs, Alzheimer und Parkinson gesehen (Kim *et al.*, 2007; Guja und Garcia-Diaz, 2012; Andreux *et al.*, 2013; Koppen und Langer, 2007; Wagner *et al.*, 2008; Mammucari *et al.*, 2010).

3.1.2 Mitochondrien als Knotenpunkte des zellulären Stoffwechsels

Eukaryotische Zellen haben mehrere, sich überschneidende Stoffwechselwege in deren Zentrum die sogenannten Kraftwerke der Zellen, die Mitochondrien, stehen. Die Endprodukte der Glykolyse, Glutaminolyse, β -Oxidation von Fettsäuren und des Abbaus von Aminosäuren laufen im Zitratzyklus (auch bekannt als Krebszyklus) zusammen. Der Zitratzyklus und vorhergehende Stoffwechselwege sind aber auch Ausgangspunkte vieler Biosynthesewege und liefern die Grundbausteine für den Aufbau neuer Aminosäuren, Nukleinsäuren, Glukose und Lipiden (Cantor und Sabatini, 2012). Dies ist jeweils abhängig davon ob eine Zelle sich teilt und neue Biomoleküle benötigt und wie die jeweilige Nährstoffversorgung ist. Die einzelnen Stoffwechselwege können den Mangel einiger Nährstoffe untereinander kompensieren (Zhdanov *et al.*, 2014).

ATP wird vor Allem durch den Abbau von Glukose in der Glykolyse und anschließender OXPHOS erzeugt. Die Glykolyse baut die Glukose Schritt für Schritt zu Pyruvat ab. Dabei werden bereits zwei Moleküle ATP pro Molekül Glukose produziert, allerdings werden auch zwei Moleküle NAD^+ zu NADH umgesetzt. Die einzelnen Zwischenschritte der Glykolyse liefern darüber hinaus Bausteine zu

Synthese von Nukleinsäuren, Lipiden und Aminosäuren (Cantor und Sabatini, 2012). Der Pentosephosphatweg (PPW) ist ein weiterer Ausgangspunkt für die Bildung von Nukleotiden und Coenzymen wie Coenzym A (CoA), NAD sowie FAD und reguliert den zellulären Redoxstatus über die Bildung von reduziertem Glutathion (GSH) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) (Gottlieb und Vousden, 2010). NADPH ist auch essenziell für den Aufbau von Lipiden. Die Aktivität der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase reguliert ob die Glykolyse oder der PPW gestartet wird (Kletzien *et al.*, 199; Fico *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 1999).

Um das in der Glykolyse verbrauchte NAD^+ schnell zu regenerieren kann Pyruvat zu Laktat fermentiert werden. Der langsamere, aber deutlich effizientere Weg, ist das Pyruvat in Acetyl-CoA umzuwandeln und im Zitratzyklus und der anschließenden oxidativen Phosphorylierung umzusetzen. Dabei entscheidet die Pyruvat-DH auf welche Weise Pyruvat umgesetzt wird. Die Pyruvat-DH selbst wird, abhängig von der Nährstoffversorgung, aber auch von zellulärem Stress durch Phosphorylierungen reguliert (Kuilman *et al.*, 2010; Kaplon *et al.*, 2013).

Die durch den Zitratzyklus und die Glykolyse entstandenen NADH und FADH_2 werden in der OXPHOS von den fünf Komplexen der Atmungskette, unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff, zu insgesamt 36 Molekülen ATP pro Molekül Glukose umgesetzt (Fogg *et al.*, 2011; Wallace, 2005). NADH wird im ersten Komplex der Atmungskette, der NADH -Dehydrogenase zu NAD^+ umgesetzt (Abb. 3.2). Im zweiten Komplex, der Succinat-DH, wird Succinat zu Fumarat umgesetzt. Dabei werden Elektronen im Komplex II auf FAD übertragen und FADH_2 erzeugt. Die Elektronen von NADH und FADH_2 werden auf Ubichinon (Coenzym Q) übertragen und zum dritten Komplex, der Cytochrom *c*-Reduktase, transportiert. Dort werden sie auf Cytochrom *c* (Cyt *c*) übertragen und schließlich im vierten Komplex, der Cytochrom *c*-Oxidase, mit molekularem Sauerstoff zu Wasser umgesetzt (Goldstein *et al.*, 2005). Dabei werden durch die Reaktionen der Komplexe I, III und IV insgesamt zehn Protonen (H^+) aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Diese erzeugen einen chemiosmotischen Protonengradienten und bauen damit das $\Delta\Psi_M$ auf (Wallace, 2005). ATP wird schließlich im Komplex V, der F_0F_1 -ATPase (auch ATP-Synthase) produziert. Die ATPase-Aktivität wird durch den zuvor gebildeten Protonengradienten angetrieben. Protonen aus dem Intermembranraum strömen durch das Enzym zurück in die Matrix

und erzeugen damit Konformationsänderungen im F_1 -Teil und somit die Umsetzung von ADP mit Phosphat zu ATP.

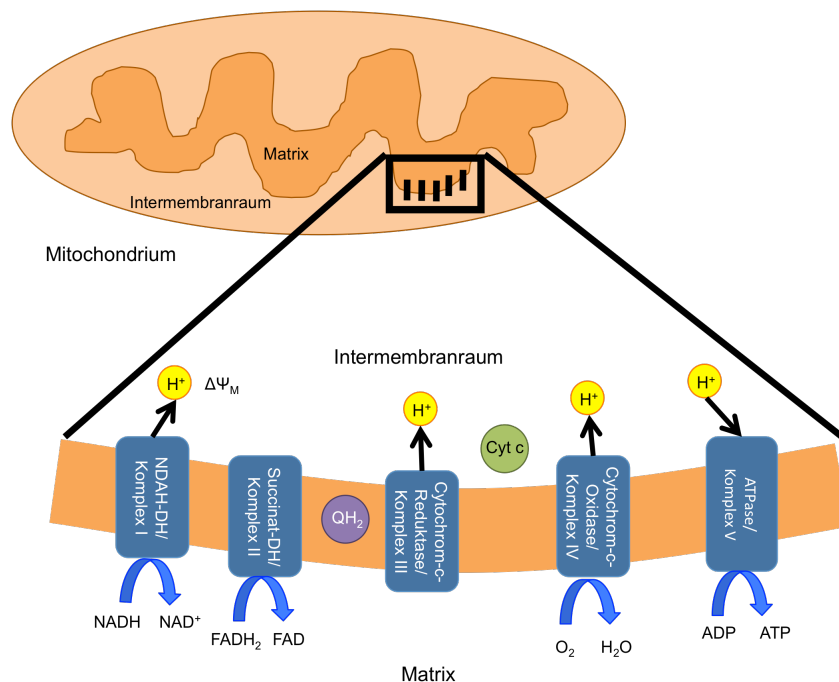


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Atmungskette

Die fünf Komplexe der Atmungskette sind in der inneren mitochondrialen Membran verankert. Die NADH-Dehydrogenase (NADH-DH) setzt NADH zu NAD^+ um und überträgt dabei Elektronen auf Ubichinon (Coenzym Q). An der Succinat-DH wird Succinat zu Fumarat umgesetzt und dabei FAD zu FADH_2 reduziert. Diese überträgt die Elektronen ebenfalls auf Coenzym Q. Das reduzierte QH_2 transportiert die Elektronen innerhalb der Membran auf die Cytochrom c-Reduktase. Von dort werden sie auf Cytochrom c (Cyt c) übertragen und im Intermembranraum zur Cytochrom c-Oxidase gebracht. Dort werden die Elektronen schließlich auf molekularen Sauerstoff unter der Bildung von Wasser übertragen. Die enzymatischen Reaktionen der Atmungskettenkomplexe I, III und IV pumpen Protonen (H^+) von der Matrix in den Intermembranraum, wodurch ein Protonengradient und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_M$) aufgebaut werden. Diesen Protonengradienten nutzt die F_0F_1 -ATPase um aus ADP ATP zu erzeugen. Dabei fließen H^+ durch die ATPase zurück in die Matrix.

Trotz der Vorteile durch die OXPHOS haben Tumorzellen in der Regel einen aeroben, glykolytischen Metabolismus (Donohoe *et al.*, 2012; Faubert *et al.*, 2013). Sie generieren also den Großteil ihres ATPs über die Glykolyse, obwohl ausreichend Sauerstoff zur oxidativen Phosphorylierung zur Verfügung stünde. Um NAD^+ zu regenerieren und die Glykolyse weiter betreiben zu können, fermentieren Tumorzellen Pyruvat zu Laktat (Wu *et al.*, 2013; Gottlieb und Vousden, 2010). Otto Warburg hatte dies 1956 als erster beschrieben. Daher wird der veränderte Metabolismus in Tumorzellen heute als „Warburg Effekt“ bezeichnet. Dieser ist die Garantie für eine schnelle Proliferation, selbst unter hypoxischen Bedingungen in soliden Tumoren (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Zusätzlich nutzen Tumorzellen die Zwischenprodukte der Glykolyse zum Aufbau von neuen Biomolekülen. Ein vollständiger Abbau zu Acetyl-CoA wäre daher nachteilig (Cantor und Sabatini, 2012;

Fogg *et al.*, 2011). Das ausgeschiedene Laktat senkt den pH-Wert der Umgebung. Dies gibt den säureresistenteren Tumorzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber normalem Gewebe (Fogg *et al.*, 2011). Außerdem werden durch die geringere OXPHOS weniger ROS in den Mitochondrien produziert. Dies schützt die Tumorzellen vor oxidativem Stress und Schäden an deren Genom, Proteinen und Lipiden (Brand *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008). Obwohl Tumorzellen den Warburg Effekt zeigen, haben sie meist immer noch eine hohe respiratorische Kapazität bewahrt und können nach Stress ihrem Metabolismus ändern und Pyruvat wieder über den Zitratzyklus und die OXPHOS abbauen (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Diese Anpassungen sind in der Regel sehr schnell und reversibel. Das Ausmaß kann dabei variieren und beruht auf dem jeweiligen zellulären Hintergrund (Loiseau *et al.*, 2009; Desquiret *et al.*, 2006). Diese Stressanpassungen des Metabolismus sind ein Schutzmechanismus der Zellen vor Chemotherapien und können zu Resistenzen führen (Fogg *et al.*, 2011). Tumorzellen mit Defekten der Atmungskette reagieren sensibler auf Chemotherapien als Zellen mit intakter OXPHOS. Der Verlust der Cytochrom c-Oxidase hat beispielsweise zur Folge, dass Zellen für die Behandlung mit Cisplatin sensibilisiert werden. Wohingegen Zellen mit intakter Respiration vor der Behandlung geschützt werden (Aichler *et al.*, 2013). Mehrere Enzyme, wie die Hexokinase, die Succinat-DH, Pyruvat-Kinase und Pyruvat-DH, steuern die Veränderungen des Metabolismus nach Stressreizen (Wu und Zhao, 2013; Diaz *et al.*, 2011). Aber auch die Proteine c-Myc, Ras, Akt, HIF und p53 sind in der Lage den Stoffwechsel mit zu regulieren (Fogg *et al.*, 2011; Wu und Zhao, 2013).

3.1.3 Der intrinsische Apoptose-Weg

Apoptose wird hauptsächlich durch zwei Signalwege, den extrinsichen, Liganden-vermittelten und den intrinsichen, mitochondrialen Weg, ausgelöst. (Green und Kroemer, 2004; Kroemer *et al.*, 2007; Mammucari und Rizzuto, 2010). Der extrinsische Weg wird über Ligandenbindung an Todesrezeptoren und daran anschließende Signalwege ausgelöst. Hingegen wird der intrinsische Apoptose-Weg durch die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (*mitochondrial outer membran permeabilisation*; MOMP) ausgelöst (Wang, 2001). Durch beide Wege werden pro-apoptotische Proteine, wie Cytochrom c, SMAC/DIABLO oder Endonuklease G aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt. Cytochrom c bildet dort mit *apoptotic protease-activation factor 1* (Apaf-1) das sogenannte Apoptosom

und aktiviert die Caspase 9 und anschließend Caspase 3. MOMP wird hauptsächlich durch Proteine der BCL-2-Familie reguliert (Abb. 3.3) (Kroemer *et al.*, 2007; Cain *et al.*, 2002; Bernardi und Azzone, 1981; Green und Kroemer, 2004; Goldstein *et al.*, 2005; Letai, 2008; Chipuk und Green, 2008; Eskes *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000).

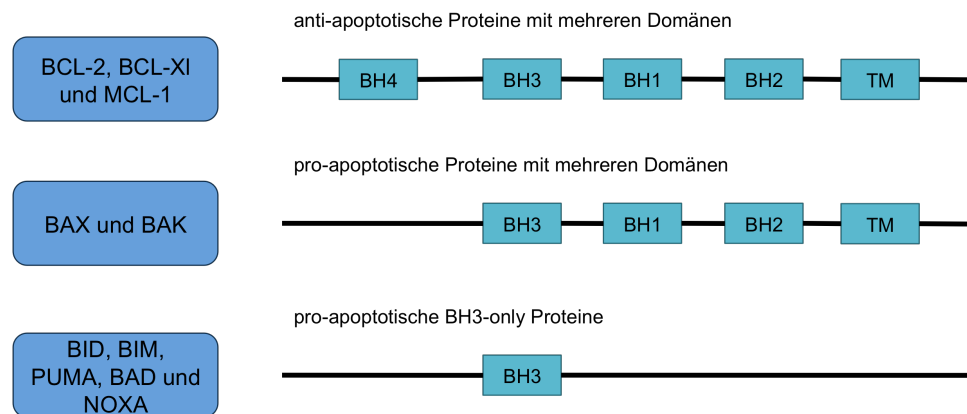


Abbildung 3.3: Aufbau verschiedener Proteine der BCL-2-Familie

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau mehrerer Proteine der BCL-2-Familie. Die anti-apoptotischen Proteine BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), BCL-XL (auch *BCL-2 like 1*; BCL2L1) und *myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL-1) bestehen aus vier verschiedenen *Bcl-2-homology*-Domänen (BH1, 2, 3 und 4) und einer Transmembrandomäne (TM). Die beiden pro-apoptotischen Proteine *BCL-2 associated X protein* (BAX) und *BCL-2-antagonistic killer* (BAK) sind aus drei verschiedenen BH-Domänen (BH1, 2 und 3) und einer TM aufgebaut. Die pro-apoptotischen BH3-only Proteine BIM (auch *Bcl-2-like protein 11*; BCL2L11), *BH3 interacting domain death antagonist* (BID), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), *Bcl-2-associated death promoter* (BAD) und *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (PMAIP1 oder NOXA) bestehen nahezu nur aus der BH3 Domäne. Abbildung nach Letai, 2008.

Darunter befinden sich die anti-apoptotischen Proteine BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), BCL-XL (auch *BCL-2 like protein 1*; BCL2L1) und *myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL-1). Alle drei bestehen aus verschiedenen *Bcl-2-homology*-Domänen (BH-Domänen 1-4) und einer Transmembrandomäne (TM), mit der sie in der äußeren mitochondrialen Membran verankert sind. Die anti-apoptotischen Proteine schützen Mitochondrien vor MOMP, indem sie pro-apoptotische Proteine binden und blockieren. Unter pro-apoptotischen BCL-2-Familie Proteinen gibt es zwei Gruppierung. *BCL-2 associated X protein* (BAX) und *BCL-2-antagonistic killer* (BAK) sind aus mehreren BH-Domänen (BH1-3) und einer TM aufgebaut und lösen MOMP direkt aus. Die sogenannten BH3-only-Proteine bestehen fast ausschließlich aus der BH3-Domäne. BIM (auch *Bcl-2-like protein 11*; BCL2L11), *BH3 interacting domain death antagonist* (BID) und *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) aktivieren BAX und BAK direkt, wohingegen *Bcl-2-associated death promoter* (BAD) und *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (PMAIP1 oder NOXA) diese nur indirekt aktivieren (Korsmeyer *et al.*, 2000; Gustafsson und Gottlieb, 2007; Letai,

2008; Cartron *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). Die Kontakte zwischen den BCL-2-Familie Proteinen werden über deren BH3-Domäne geschlossen (Chittenden *et al.*, 1995), wobei die isolierte BH3-Domäne ausreichend ist, um über BAX MOMP auszulösen und Cytochrom c freizusetzen (Letai *et al.*, 2002).

MOMP wird ausgelöst, indem BAK und BAX in der äußeren mitochondrialen Membran oligomerisieren und damit Poren formen. Durch diese Poren werden dann pro-apoptotische Proteine aus dem IMS freigesetzt und damit die Apoptose initiiert (Wang *et al.*, 2002; Cartron *et al.*, 2004; Desagher *et al.*, 1999; Kuwana *et al.*, 2002; Letai *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 1998; Manari *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2000). Die anti-apoptotischen BCL-2-Familie Proteine können dies durch Bindung an BAK und BAX aber auch an BAD, BIM und NOXA verhindern (Polster *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001; Certo *et al.*, 2006; Letai *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 1996). BAX und BAK sind essenziell für die Induktion der intrinsischen Apoptose (Hsu *et al.*, 1997; Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). BAK ist permanent an der Membran gebunden, wobei BAX erst nach Stress an die Mitochondrien lokalisiert. Dafür findet diese Lokalisation vom Zytosol an die Mitochondrien innerhalb von 30 min statt. BAX scheint bei der Induktion von MOMP wichtiger zu sein als BAK (Letai, 2008; Martinou und Youle, 2011; Chandra *et al.*, 2005; Wolter *et al.*, 1997). PUMA und NOXA sind wichtige BH3-only Proteine, die p53-abhängig den intrinsischen Apoptose-Weg initiieren (Villunger *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2000; Nakano und Vousden, 2001).

BAK kann neben BCL-2, MCL-1 oder BCL-XL auch an *voltage dependent anion channel 2* (VDAC2) gebunden sein. Die BH3-only Proteine BID, BIM, und BAD können BAK von VDAC2 lösen und ermöglichen damit dessen Oligomerisierung (Chandra *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2003). Neben MOMP kann auch die *permeability transition pore* (PTP) den intrinsischen Apoptose-Weg auslösen. Diese wird durch den zellulären Redoxstatus und das mitochondriale Membranpotential reguliert und ist unabhängig von BAX und BAK. An der PTP sind unter anderem VDAC2, Hexokinase und Cyclophilin D beteiligt (Brenner und Grimm, 2006; Ortega *et al.*, 2011).

Über BH3-profiling wird versucht, Vorhersagen über die Empfindlichkeit eines Tumors gegenüber der Therapie zu machen (Letai, 2008; Yip und Reed, 2008). Hohe BCL-2- oder BCL-XL-Expressionen, wie sie in vielen Tumoren zu finden sind, haben eine schlechte Prognose zur Folge, da diese Proteine MOMP und die intrinsische Apoptose unterdrücken. Aber auch der Verlust von pro-apoptotischen

BCL-2-Familie Proteinen kann zu Tumorprogression und Resistenzen gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika führen (Debatin *et al.*, 2002; Reed, 2008).

Durch Inhibitoren, wie ABT-737, können BCL-2 und BCL-XL blockiert werden und die Tumore damit sensibilisiert werden. Allerdings wirkt ABT-737 nicht auf MCL-1. Daher kann eine hohe MCL-1-Expression wiederum Resistenzen gegen ABT-737 auslösen (Yip und Reed, 2008; Certo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Konopleva *et al.*, 2006; Oltersdorf *et al.*, 2005; van Delft *et al.*, 2006).

3.2 Regulation wichtiger mitochondrialer Funktionen durch p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse und Signalwege, ist aber vor allem für seine transkriptionelle Regulation bekannt. P53-Zielgene regulieren wiederum den Zellzyklus, die Apoptose und die DNA-Reparatur und schützen die Zellen damit vor der Entstehung von Tumoren (Hussain *et al.*, 2004; Bode und Dong, 2004). P53 wird über post-translationale Modifikationen (PTMs) stabilisiert und reguliert (Appella und Anderson, 2001), wobei eine Vielzahl an Modifikationen bereits bekannt ist. Es wird unter anderem phosphoryliert, acetyliert, ubiquitiniert und sumoyliert (Bode und Dong, 2004).

3.2.1 Aktivierung und Stabilisierung von p53 durch post-translationale Modifikationen

P53 besteht aus 393 Aminosäuren und mehreren funktionellen Domänen. Der N-Terminus enthält eine unstrukturierte Transaktivierungsdomäne (TAD). Durch Phosphorylierungen der TAD wird p53 aktiviert und reguliert (Joerger und Fersht, 2008; Bode und Dong, 2004; Gatti *et al.*, 2000; Waterman *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2002; Oda *et al.*, 2000; Siciliano *et al.*, 1997; Banin *et al.*, 1998; Bulavin *et al.*, 1999). Die zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD oder Kerndomäne p53C) ist strukturiert und für die spezifische Bindung an der DNA verantwortlich. Die DBD reguliert sowohl die Transkription von Zielgenen nach Stress, als auch die direkte Interaktion von p53 an Mitochondrien und ist somit essenziell für dessen Funktion. Da p53 die Entstehung von Krebs unterdrückt, ist das Protein oder seine Signalwege in rund 50% aller Tumore mutiert (Hager und Gu, 2014; Hainaut *et al.*, 2000). Die meisten der 17.000-18.000 bekannten Mutationen von p53 finden sich im Bereich der DNA-Bindungsdomäne wieder (Abb. 3.4).

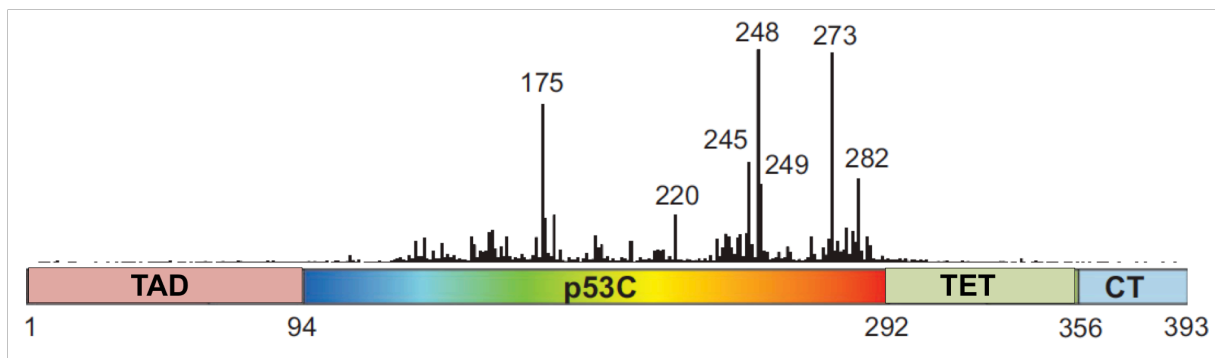


Abbildung 3.5: Aufbau von p53 und Häufigkeit von Mutationen des Proteins

P53 kann in mehrere funktionelle Domänen unterteilt werden. Die Aminosäuren (AS) 1-94 bilden die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD). Darauf folgt zwischen den AS 94-292 die DNA-Bindungsdomäne (DBD) oder auch Kerndomäne (p53C) von p53. In diesem Bereich sind die meisten Mutationen von p53 zu finden. Von der AS 292-356 ist die Tetramerisierungsdomäne (TET) zu finden. Der C-terminale Bereich (CT) von p53 wird auch als regulatorische Domäne bezeichnet und ist zwischen den AS 356-393. Abbildung modifiziert nach Joerger und Fersht, 2008.

Dabei sind besonders Arginin 175 (R175), Tyrosin 220 (Y220), Serin 245 (S245), Glycin 248 (G248), G249, Histidin 273 (H273) und R282 häufig mutiert (Joerger und Fersht, 2008; Bode und Dong, 2004). An die DBD schließt sich die strukturierte Tetramerisierungsdomäne (TET) an. P53 ist nur als Tetramer im Kern transkriptionell aktiv, wobei es an Mitochondrien als Monomer vorkommt. Daher ist die TET besonders für die transkriptionellen Funktionen von p53 wichtig (Joerger und Fersht, 2008; Bode und Dong, 2004; Friedman *et al.*, 1993). Die letzte Domäne ist der C-Terminus (CT), der auch als regulatorische Domäne bezeichnet wird. Dieser Bereich ist wie der N-Terminus ungefaltet, enthält aber sehr viele basische, acetylierbare Aminosäuren und bindet damit unspezifisch an DNA (Joerger und Fersht, 2008). Die Acetylierung des C-Terminus führt zu einer Stabilisierung von p53 in tritt infolge von Stress auf (Ito *et al.*, 2001; Barlev *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2000).

Ubiquitinierung: proteasomaler Abbau oder Veränderung der Lokalisation von p53

Die zytosolische Fraktion von p53 hat unter normalen Bedingungen eine kurze Halbwertszeit, da sie an *murine double minute 2 homolog* (MDM2, auch als HDM2 bekannt) gebunden vorliegt und einem ständigen proteasomalen Abbau durch das 26S Proteasom unterliegt (Abb. 3.5).

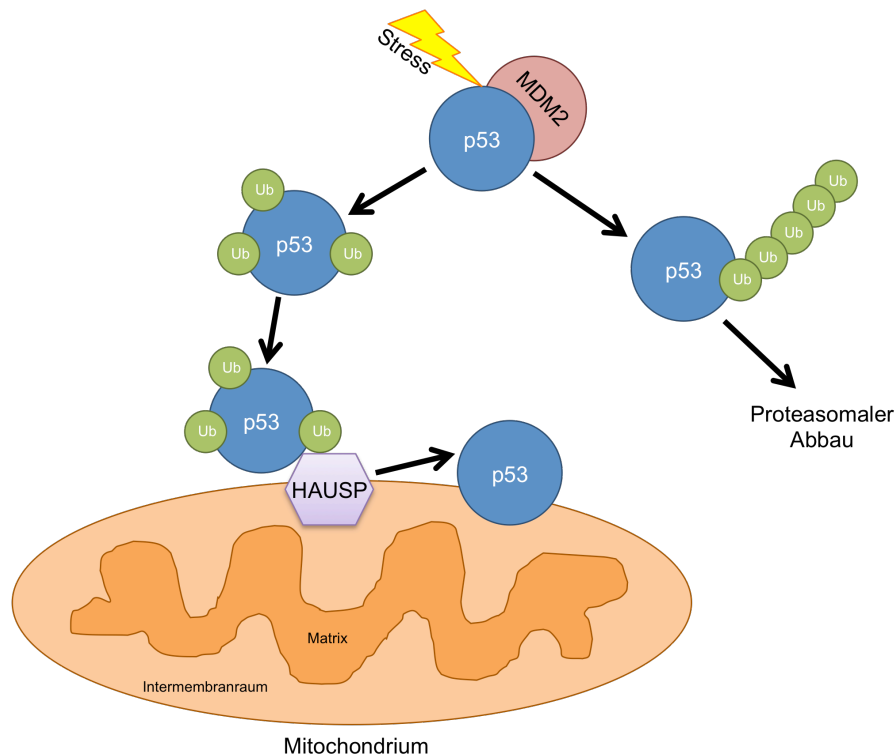


Abbildung 3.6: Veränderungen der Lokalisation von p53 oder proteasomaler Abbau durch Ubiquitinierungen

Unter normalen Bedingungen unterliegt das zytosolische p53 einem ständigen Gleichgewicht. *Murine double minute 2 homolog* (MDM2) bindet an p53 und bringt mehrere Ubiquitinierungen (Ub) an. Diese Polyubiquitinierung ist ein Signal für den Abbau im 26S Proteasom. Nach Aktivierung durch Stressreize wird p53 acetyliert und phosphoryliert. Dies führt zu einer schwächeren Bindung an MDM2 und dazu, dass ein Teil des zytosolischen p53 monoubiquitiniert wird. Das mehrfach monoubiquitinierte p53 lokalisiert an Mitochondrien und wird dort durch *herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease* (HAUSP) deubiquitiniert. Abbildung nach Vaseva und Moll, 2009.

Ubiquitinierungen werden durch eine Abfolge aus einem E1 aktivierendem, einem E2 konjugierendem und einem E3 ligierendem Enzym in Proteinen angebracht. Dabei werden Lysinreste mit Ubiquitin modifiziert. MDM2 ist eine E3 Ubiquitin-Ligase, die p53 ubiquitiniert und damit reguliert. Die Monoubiquitinierung von p53 führt zu dessen Export aus dem Nukleus und zur Lokalisation an Mitochondrien. Die Polyubiquitinierung hingegen führt zum proteasomalen Abbau des Proteins (Bode und Dong, 2004; Blattner *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Vaseva und Moll, 2009; Mihara *et al.*, 2003; Vaseva und Moll, 2013; Marchenko *et al.*, 2007; Brooks und Gu, 2011 a). MDM2 selbst steht in einem negativen Feedback zu p53 und wird von ihm transkriptionell reguliert (Brooks und Gu, 2011 a; Kubbutat *et al.*, 1997; Marchenko *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011; Unger *et al.*, 1999). Durch Stress wird p53 aktiviert und an den beiden N-terminalen Serinen 15 und 20 phosphoryliert. Dadurch wird die Bindung an MDM2 reduziert und p53 stabilisiert (Unger *et al.*, 1999; Brooks und Gu, 2011 a; Kruse und Gu, 2009). Andere PTMs, wie die Acetylierung konkurrieren um

die gleichen Aminosäuren, wie die Ubiquitinierung. Beispielweise können alle sechs C-terminalen Lysine von p53 sowohl acetyliert, als auch ubiquitiniert werden (Lohrum *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2000). Daher kann durch Acetylierung die Ubiquitinierung von p53 verhindert und damit dessen Signalwege beeinflusst werden (Li *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002 b). Da MDM2 in einigen Tumorzellen stark exprimiert ist, ist die Acetylierung von p53 wichtig um das Protein zu aktivieren und zu stabilisieren (Hupp und Lane, 1994; Bode und Dong, 2004).

Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP) (auch als *Ubiquitin-specific-processing protease 7* (USP7) bekannt) deubiquitiniert p53 beispielsweise an Mitochondrien und startet damit die Interaktion von p53 mit BCL-2-Familie Proteinen und MOMP (Li *et al.*, 2002; Marchenko *et al.*, 2007). Um p53 in Tumoren zu aktivieren und in diesen den intrinsischen Apoptose-Weg zu starten, werden MDM2 Antagonisten, sogenannte Nutlins eingesetzt (Palani *et al.*, 2012; Van Maerken *et al.*, 2009; Michaelis *et al.*, 2011).

Erhöhte Proteinstabilität, DNA-bindungsspezifität und Induktion der Apoptose durch Acetylierung von p53

Durch Stress wird p53 von mehreren Histonacetyltransferasen (HATs) acetyliert (Abb. 3.6) und war nach Histonen das erste Protein von dem bekannt wurde, dass es über De-/Acetylierung reguliert wird (Gu und Röder, 1997). Dadurch erhöht sich dessen Proteinstabilität und spezifische DNA-Bindung. Mehrere HATs, wie Tip60, CBP/p300 und PCAF acetylieren und regulieren p53 (Luo *et al.*, 2001; Barlev *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2000; Bode und Dong, 2004; Sakaguchi *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Sykes *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1998; Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003).

Die Acetylierung in p53 kann wiederum weitere HATs und andere Transkriptionsfaktoren an Promotoren rekrutieren und damit die Transkription verstärken (Goodman und Smolik, 2000). Generell spielen post-translationale Modifikationen von p53 eine entscheidende Rolle für dessen Funktion und Aktivität (Brooks und Gu, 2011 b). Durch Deacetylierung wird die Aktivität von p53 gesenkt. Von den HDACs 1, 2 und 3, sowie von SIRT1 ist bekannt, dass sie p53 deacetylieren können (Choi *et al.*, 2015; Juan *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2014; Lee und Gu, 2013; Luo *et al.*, 2004; Gonfloni *et al.*, 2014). Dabei kann eine vollständige Acetylierung von

p53 nur erreicht werden, wenn sowohl die drei HDACs als auch SIRT1 inhibiert werden (Lou *et al.*, 2004). CBP/p300 und MDM2 konkurrieren um die gleichen Bindestellen in p53. Daher kann CBP/p300 p53 vor dem proteasomalen Abbau schützen (Joerger und Fersht, 2008; Gu *et al.*, 1997; Teufel *et al.*, 2007; Kussie *et al.*, 1996; Schon *et al.*, 2002; Marine und Jochemsen, 2005). MDM2 kann wiederum die Acetylierung von p53 durch PCAF und CBP/p300 verhindern und HDAC1 rekrutieren (Benkirane *et al.*, 2010).

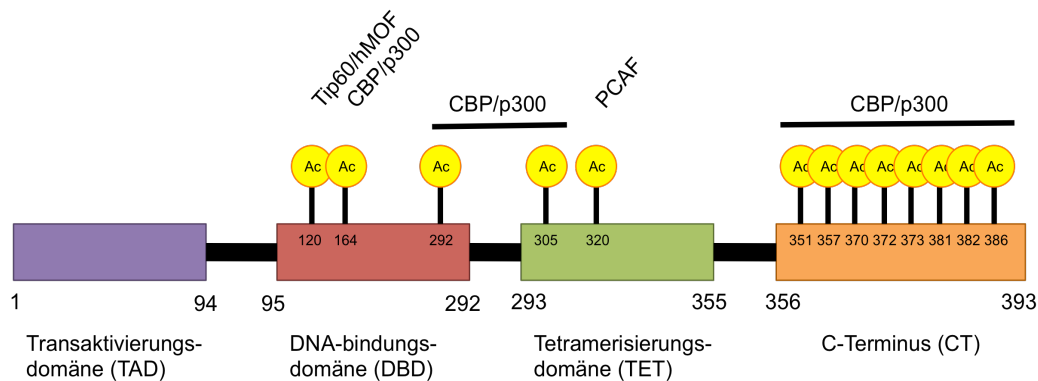


Abbildung 3.6: Ausgewählte Acetylierungsstellen in p53 und die zugehörigen Histonacetyltransferasen (HATs)

Mehrere HATs, wie Tip60, CBP/p300 und PCAF acetylieren p53 an verschiedenen Lysinresten. Diese Acetylierungen finden sich vor allem im Bereich des C-Terminus (CT), aber auch in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) und der Tetramerisierungsdomäne (TET) und regulieren die Aktivität und Funktion von p53. Abbildung nach Brooks und Gu, 2011 (b).

Die Acetylierung von p53 hat mehrere Folgen. Die Acetylierung der Lysine 120 und 164 (K120 und K164) im Bereich der DBD von p53 durch TIP60, bzw. hMOF und CBP/p300 steigern die Rate der intrinsischen Apoptose und die Interaktion mit BCL-2-Familie-Proteinen sowie die DNA-Bindung. Die Modifikation dieser beiden Lysine scheint essenziell für die Interaktionen von p53 an den Mitochondrien zu sein (Mellert *et al.*, 2011; Sykes *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2006; Arbely *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Sykes *et al.* (2006) zeigten, dass durch die Mutation von K120 ein Teil der transkriptionellen Aktivität von p53 verloren ging. Die Acetylierung des Lysin 320 steht im Zusammenhang mit verminderter N-terminaler Phosphorylierung, gesteigerten Reparaturprozessen und p21-Aktivierung nach DNA-Schäden (Chao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Knights *et al.*, 2006). Hingegen führt die Acetylierung von K373 zu einer gesteigerten N-terminalen Phosphorylierung, transkriptionellen Aktivierung von pro-apoptischen p53-Zielgenen und gesteigerter Apoptose (Zhang *et al.*, 2006; Knights *et al.*, 2006). Eine verstärkte Acetylierung von K382 steigert die Apoptose-Rate weiter (D'Orazi *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Smeek und Lohrum, 2010).

Obwohl der C-Terminus multipel modifiziert werden kann, gibt es über dessen Funktion bei der Transkription und Apoptose-Initiation widersprüchliche Aussagen. Fest steht, dass die Acetylierung des C-Terminus die Bindung an MDM2 verringert, dessen proteasomalen Abbau verhindert und damit die zytosolische p53-Proteinmenge erhöht (Li *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2008). Außerdem steigert die Acetylierung des C-Terminus die spezifische DNA- und Promotorbindung von p53 und führt zu einer Aktivierung, unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus (Liu *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008). Die Acetylierung von p53 ist daher eine wichtige PTM im Bezug auf dessen Aktivität und Funktion.

3.2.2 Induktion der intrinsischen Apoptose durch p53

Es ist bekannt, dass ein Teil des zytosolischen monomeren p53 nach Monoubiquitinierung an Mitochondrien lokalisiert ist, obwohl es keine mitochondriale Zielsequenz hat (Vaseva und Moll, 2009; Mihara *et al.*, 2003; Vaseva und Moll, 2013; Marchenko *et al.*, 2007; Brooks und Gu, 2011 a). Die Acetylierung von p53 spielt für dessen Lokalisation keine Rolle (Nemajerova *et al.*, 2005), jedoch ist die anschließende Interaktion von p53 mit mitochondrialen Proteinen davon abhängig (Liu *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012). An der mitochondrialen Membran interagiert p53 direkt mit Proteinen der BCL-2-Familie (Abb. 3.7), obwohl es selbst keine BH3-Domäne hat (Kroemer *et al.*, 2007; Chipuk *et al.*, 2004; Moll *et al.*, 2005; Leu *et al.*, 2004).

Ausgelöst durch Stress bindet und blockiert p53 an die anti-apoptotischen Proteine BCL-XL, MCL-1 und BCL-2. Damit werden zuvor gebundene pro-apoptotische Proteine freigesetzt (Cheng *et al.*, 2003; Mihara *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2006). P53 interagiert dabei über seine DBD zuerst mit BCL-2 und BCL-XL bevor es an BAK bindet (Sot *et al.*, 2007; Pietsch *et al.*, 2009). Durch die Interaktion von p53 mit MCL-1 wird BAK von MCL-1 gelöst (Mihara *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2006; Leu *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 2008). Weiterhin interagiert p53 direkt mit den pro-apoptotischen Proteinen BAX, BAK, PUMA, NOXA und BID und steigert über transkriptionelle Regulation zusätzlich die Proteinmengen von BAX, BAK, BAD, PUMA und NOXA (Jiang *et al.*, 2006; Jeffers *et al.*, 2003; Mihara *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004; Villunger *et al.*, 2003; Kannan *et al.*, 2001; Oda *et al.*, 2000; Nakano und Voutsden, 2001).

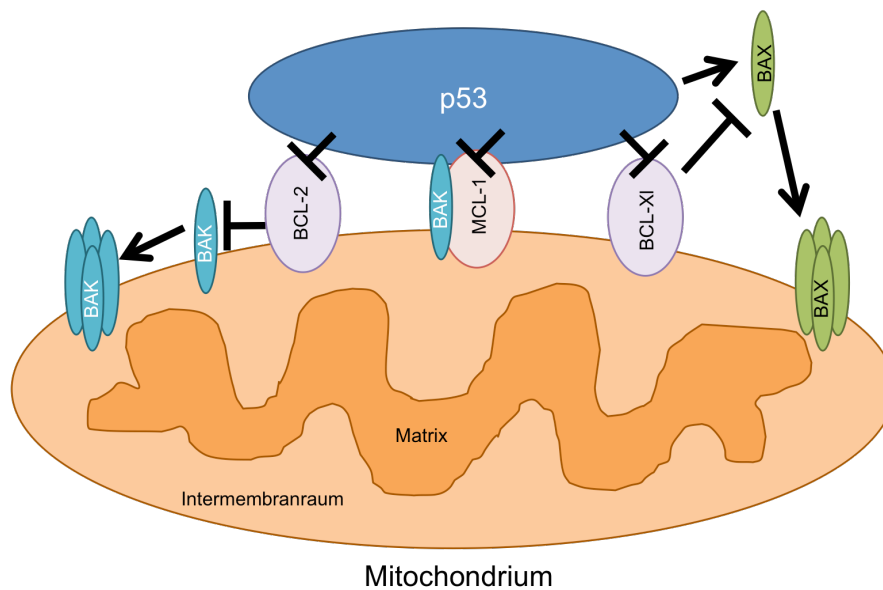


Abbildung 3.1: Interaktion von p53 an Mitochondrien

Mitochondrial lokalisiertes p53 interagiert mit verschiedenen Proteinen der BCL-2-Familie. Beispielhaft wurde hier die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK sowie die Rekrutierung von zytosolischem BAX durch p53 dargestellt. Dabei blockiert p53 die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-XI und MCL-1 an der äußeren mitochondrialen Membran und setzt die pro-apoptotischen Proteine frei, interagiert aber auch direkt mit ihnen, um deren Oligomerisierung einzuleiten. Infolge dessen kommt es zu Permeabilisierung der Membran und Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Abbildung nach Vaseva und Moll, 2009.

BAX und PUMA beeinflussen wiederum die Lokalisation von p53 und steigern dessen mitochondriale Lokalisation (Wolff *et al.*, 2008; Chipuk *et al.*, 2005). Diese Interaktionen von p53 an der mitochondrialen Membran führen schließlich zur Oligomerisierung von BAX und BAK und damit zu MOMP (Jiang *et al.*, 2006; Marchenko *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2010; Green und Kroemer, 2004; Vander Heiden *et al.*, 1997; Hemann und Lowe, 2006). Durch die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran werden pro-apoptotische Proteine des IMS in das Zytosol freigesetzt und initiieren dort den Caspase-abhängigen intrinsischen Apoptose-Weg (Kroemer *et al.*, 2007; Mihara *et al.*, 2003; Leu *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2010; Green und Kroemer, 2004). Die Lokalisation von p53 an Mitochondrien geht daher direkt mit dem Verlust des $\Delta\Psi_M$, der Freisetzung von Cytochrom c und der Aktivierung von Caspasen einher (Marchenko *et al.*, 2000). Veränderungen der Aktivität von p53 durch gesteigerte Acetylierung könnte die Möglichkeit bieten, Tumorzellen gezielter zu behandeln.

3.2.3 P53-abhängige Regulation des Stoffwechsels

Neben seiner Rolle als Tumorsuppressor, reguliert p53 auch den zellulären Metabolismus. Dabei beeinflusst p53 die Glykolyse, die Glutaminolyse, die OXPHOS, die Nukleotid-Biosynthese, die mitochondriale Integrität und die β -Oxidation von Fettsäuren (Vousden und Ryan, 2009; Gottlieb und Vousden, 2010; Maddocks und Vousden, 2011). Der zelluläre Metabolismus wird also an mehreren Stellen von p53 reguliert. P53 aktiviert die oxidative Phosphorylierung durch die Regulation von *cytochrome c oxidase assembly protein* (SCO2) (Matoba *et al.*, 2006), der Untereinheit I der Cytochrom *c*-Oxidase (COXI) (Okamura *et al.*, 1999) und durch direkte Proteininteraktion mit der Untereinheit II der Cytochrom *c*-Oxidase (COXII) (Zhou *et al.*, 2007). P53 senkt dabei gleichzeitig die Glykolyse-Aktivität durch transkriptionelle Regulation von Glukose-Importern (GLUT1 und 4; Schwartzberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2004), die indirekte Regulation von GLUT3 (Kawauchi *et al.*, 2008) und die Aktivierung der Fructose-2,6-bisphosphatase *TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator* (TIGAR) (Bensaad *et al.*, 2006). TIGAR steigert danach die Aktivität des PPWs (Gottlieb und Vousden, 2010). P53 reguliert außerdem die Aktivität der Glutaminase 2 (Hu *et al.*, 2010; Hager und Gu, 2014) und besitzt Funktionen innerhalb der mitochondrialen Matrix. Dabei interagiert p53 mit Nf- κ B und reguliert somit zusätzlich den mitochondrialen Metabolismus (Johnson *et al.*, 2011; Johnson and Perkins, 2012). Außerdem interagiert p53 mit der mitochondrialen DNA Polymerase γ (mtDNA Pol γ) und schützt Zellen dadurch vor Mutationen und Schäden der mtDNA (Achanta *et al.*, 2005). Zusammengefasst steigert p53 die oxidative Phosphorylierung und senkt die Glykolyse und kehrt damit in Tumorzellen den Warburg Effekt teilweise um. Die Beeinflussung des Metabolismus parallel zur klassischen Chemotherapie könnte die Effektivität von DNA-schädigenden Substanzen erhöhen.

3.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, Stressanpassungen infolge von DNA-schädigender Chemotherapie zu untersuchen. Durch den Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan (CPT-11) sollte das Genom von Tumorzellen geschädigt und DNA-Schadensantworten ausgelöst werden. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf p53-vermittelten Signalwegen liegen. Der Tumorsuppressor p53 hat sowohl transkriptionelle, als auch nicht-transkriptionelle Funktionen, mit denen er die

Zellvitalität durch den Stoffwechsel, die DNA-Reparatur und die Apoptose reguliert. Dabei stehen Mitochondrien im Zentrum vieler Stoffwechselwege und sind für die Initiation des intrinsischen Apoptose-Weges mit verantwortlich. Um p53-abhängige, mitochondriale Veränderungen der Zellvitalität zu untersuchen, wurden zwei Genotypen, p53wt und p53-/-, der humanen Darmkrebs-Zelllinie HCT116 als Testsystem gewählt. Durch den HDACi Entinostat (MS-275) sollten die post-translationalen Modifikationen, dabei vor allem die Acetylierung, von p53 verstärkt werden. Da PTMs die Aktivität und Funktion von p53 steigern, sollten p53-abhängige Veränderungen der Zellen durch MS-275 verstärkt werden können.

Der zelluläre Metabolismus der HCT116 Zellen sollte durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs und des MTT-Umsatzes nach genotoxischem Stress untersucht werden. Zusätzlich sollte durch die massenspektroskopische Analyse zellulärer Nährstoffe, der Verbrauch, bzw. die Produktion dieser Metabolite betrachtet werden. Infolge des DNA-Schadens könnte es zur Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Weges kommen. Daher sollten mittels Durchflusszytometrie das mitochondriale Membranpotential, die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies und der Zelltod bestimmt werden. Durch Western Blot und zelluläre Fraktionierungen sollte die post-translationalen Modifikation und Lokalisation von p53 untersucht werden. Des Weiteren sollte durch Western Blot betrachtet werden, ob der intrinsische Apoptose-Weg durch den ausgeübten Stress aktiviert wurde und wie sich die Expression von BCL-2-Familie Proteinen verändert. Die PTMs von p53 sollten zusätzlich durch Massenspektroskopie analysiert werden, um spezifische Veränderungen nach den Einzelbehandlungen mit CPT-11 und MS-275, bzw. der Kombination aus beiden, zu finden. Ziel war es dabei, die Acetylierung von p53 in Zusammenhang mit potentiellen Veränderungen der Zellvitalität zu bringen. Die Expression von p53-Zielgenen und mitochondrial kodierten mRNAs sollte durch qRT-PCR untersucht werden. Um mitochondriale Schäden und Änderungen der Zellmorphologie näher zu betrachten, sollten diese durch Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht werden. Im Zusammenhang mit mitochondrialen Schäden sollten weiterhin die Mengen an Autophagie in den HCT116 Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die HCT116 p53-/- Zellen dienen als Vergleich zu den HCT116 p53wt Zellen. Die Gesamtheit der Messungen sollte zeigen, ob und wie PTMs von p53 die Zellvitalität verändert und ob die Kombination aus CPT-11 und MS-275 diese gezielt verstärken konnte.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Name	Hersteller
2-thenyltrifluoroacetone (TTFA)	Sigma Aldrich
2',7'-dichlorofluoresceindiacetat (DCFDA)	Sigma Aldrich
3'3-Dihexyloxacarcocyaniniodid (DiOC ₆ (3))	Life technologies
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Alfa Aesar
5-Fluoruracil (5-FU)	Enzo Life Science
Acrylamid-Lösung (30%) + 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem
Antipain	Carl Roth
Aprotinin	Carl Roth
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS ³)	Life technologies
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA, Albumin Fraktion V)	Carl Roth
Bromphenolblau	Serva
β-Glycerophosphat	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Serva
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Roti□ Nanoquant)	Carl Roth
Chloramphenicol	Carl Roth
Chloroform (CHCl ₃)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich
Dithiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Doxorubicin	Enzo Life Science
ECL-Lösung (SuperSignal□ West Pico Chemiluminescent Substrate)	Thermo Scientific
ECL-Lösung (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate)	Merck Millipore
Entinostat (MS-275)	Selleck chemicals
Essigsäure, reinst	Carl Roth
Ethanol (EtOH), reinst	VWR
Ethanol, MEK vergällt	Mineralöle Albert
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma Aldrich
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Hydroxyurea (HU)	Sigma Aldrich

Irinotecan (CPT-11)	Sigma Aldrich
Isopropanol, reinst	VWR
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	FLUKA
KU-55933	Abcam
Leupeptin	Carl Roth
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth
Magermilchpulver	Saliter
Natriumazid (NaN_3)	Sigma Aldrich
Natriumbutyrat	Sigma Aldrich
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH), 1 M	Carl Roth
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma Aldrich
Nicotinamid (NAM)	Sigma Aldrich
Nocodazol	Enzo Life Science
Nonidet P-40 (NP-40, Igepal CA-630)	Sigma Aldrich
Oxaliplatin (L-OHP)	Selleck chemicals
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich
Rotenon	Abcam
Salzsäure (HCl), 37%	Carl Roth
Salzsäure (HCl), 1 M	Carl Roth
Saccharose	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Trichostatin A (TSA)	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth
Triton TM X-100	Sigma Aldrich
Tween® 20	Carl Roth
z-VAD-FMK	Enzo Life Science

4.1.2 Kits, Lösungen und TaqMan®-Sonden

Name	Hersteller
Cyto-ID® <i>Autophagy detection kit</i>	Enzo Life Science
Dynabeads® (Protein G) <i>magnetic beads</i>	Life technologies
NuPAGE® LDS <i>Sample Buffer</i> (4X)	Life technologies
peqGOLD RNAPure™	Peqlab
Page Ruler™ Plus <i>Prestained Protein Ladder</i> , 10-250 kilo Dalton (kDa)	Life technologies
Lipofectamine® 2000	Life technologies
DNase I, <i>RNase-free</i>	Thermo Scientific
TaqMan® <i>Gene Expression Assay</i>	Life technologies
COX2: Hs02596865_g1	
NDH: Hs02596873_s1	
CYTB: Hs02596867_s1	
b2M: Hs00187842_m1	
BBC3: Hs00248075_m1	
CDKN1A: Hs00355782_m1	
MDM2: Hs99999008_m1	
BAX: Hs00180269_m1	

4.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
anti-β-Aktin	Kaninchen polyklonal	Sigma	1:50.000
anti-ATM	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:5000
anti-ATM phospho S1981	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:5000
anti-BAK	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:1000
anti-BAX	Maus monoklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-BIM	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:1000
anti-Caspase 3 cleaved	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling	1:5000
anti-ATP5A (Complex V)	Maus monoklonal IgG2b	Abcam	1:5000
anti-Cytochrom c	Maus monoklonal IgG1	Santa Cruz Biotechnology	1:2500
anti-H2AX phospho S139	Maus monoklonal IgG1	Merck Millipore	1:1000
anti-GAPDH	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:10.000
anti-HSP90α/β	Maus monoklonal IgG2a	Santa Cruz Biotechnology	1:10.000
anti-NOXA	Maus monoklonal IgG1	Abcam	1:500
anti-PARP1 cleaved	Maus monoklonal IgG1	BD PharMingen	1:5000

anti-PUMA	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling	1:5000
anti-p21	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:2500
anti-p53 (DO-1)	Maus monoklonal IgG2a	Santa Cruz Biotechnology	für IP
anti-p53 (Bp53-12)	Maus monoklonal IgG2a	Santa Cruz Biotechnology	1:50.000 & für IP
anti-p53 acetyl K305	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:1000
anti-p53 acetyl K373	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:1000
anti-p53 acetyl K381	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:2500
anti-p53 acetyl K382	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling	1:1000
anti-p53 phospho S6	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:5000
anti-p53 phospho S9	Kaninchen monoklonal IgG	Abcam	1:1000
anti-TIMM23	Kaninchen polyklonal IgG	Abcam	1:5000
anti- α -Tubulin	Maus monoklonal IgG1	Sigma Aldrich	1:5000

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG H&L (HRP)	Ziege	Abcam	1:10.000
Anti-Maus IgG H&L (HRP)	Ziege	Abcam	1:10.000
IRDye800CW-conjugated anti-Maus	Esel	LiCor Biotechnologies	1:10.000
IRDye800CW-conjugated anti-Kaninchen	Esel	LiCor Biotechnologies	1:10.000

4.1.4 Zelllinien

Name	Ursprung	Beschreibung
HCT116 (p53wt)	human	kolorektale Karzinom Zelllinie (durch DSMZ verifiziert)
HCT116 p53-/-	human	p53-negative kolorektale Karzinom Zelllinie (Bunz <i>et al.</i> , 1998)
K562	human	myeloische Leukämie Zelllinie

4.1.5 Medien und Zellkulturbedarf

Name	Hersteller
Accutase	GE healthcare
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) <i>low-glucose</i> (1 g/l)	GE healthcare
DMEM <i>high-glucose</i> (5 g/l)	GE healthcare
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (PBS) (1x)	GE healthcare
<i>Foetal calf serum</i> (FCS; fötales Kälberserum)	GE healthcare
10 mg/ml Puromycin-Lösung	Invivogen
Gentamycin (200x)	GE healthcare
Opti-MEM® I	Life Technologies
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI-1640)	GE healthcare

Trypsin-EDTA 1x

Sigma Aldrich

Kulturmedium: DMEM/RPMI mit 10% FCS und 0,5% Gentamycin

Versuchs- und Transfektionsmedium: DMEM/RPMI mit 10% FCS

Einfriermedium: DMEM/RPMI mit 10% FCS und 10% DMSO

4.1.6 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden aus den Beständen des Lehrstuhls Biochemie entnommen. Um die Vervielfältigung der Konstrukte kümmerte sich Sigrid Reichard. Folgende Plasmide wurden verwendet:

p53wt: pRK5 Flag

p53 6KR: pRK5 Flag

Mock: pcDNA 3.1

GFP: pEGFP-C1

shCtl: pSUPER

4.1.7 Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer

1x PBS mit 5% Magermilchpulver und 0,05% (v/v) Tween® 20

Diethyldicarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser

0,1% (v/v) DEPC in ddH₂O

Hoch-Salz-Puffer

20 mM Tris/HCl; pH 8,1

500 mM NaCl

0,1% (w/v) SDS

1% (v/v) Triton™ X-100

1 mM EDTA

Homogenisationspuffer

10 mM Tris/HCl; pH 6,7

10 mM KCl

150 mM MgCl₂

IP-Lysepuffer

50 mM Tris/HCl; pH 7,5

50 mM NaF

5 mM Natriumpyrophosphat

270 mM Saccharose

1 mM EDTA

1% (v/v) NP-40

1% (w/v) Natriumdesoxycholat

frisch zugeben:

Proteaseinhibitortablette	
10 mM	NAM
10 µM	TSA
10 mM	Natriumbutyrat
1 mM	Na ₃ VO ₄
10 mM	β-Glycerophosphat
Laemmli-Probenpuffer (6x)	
35% (v/v)	β-ME
350 mM	Tris-HCl; pH 6,8
30% (v/v)	Glycerin
10% (w/v)	SDS
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
MS-Lysepuffer	
50%	Methanol
30%	Acetonitril
20%	ddH ₂ O
Natriumcarbonatlösung, pH 11,5	
100 mM	Na ₂ CO ₃
PBS (1x); pH 7,25	
137 mM	NaCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2,7 mM	KCl
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
PBS-T (1x)	
1x PBS mit 0,05% (v/v) Tween® 20	
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	
10000 Units/ml	Aprotinin
100 mg/ml	Benzamidine
2 mg/ml	Antipain
1 mg/ml	Leupeptin
RIPA (<i>radioactive immunoprecipitation assay</i>)-Puffer	
150 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl; pH 8.0
1 mM	EDTA
1% (v/v)	Triton™ X-100
1% (w/v)	Natriumdesoxycholat
0,1% (w/v)	SDS
frisch zugeben:	
0,5 mM	PMSF
0,2% (v/v)	PIC-Lösung
10 mM	NAM

1 mM	NaF
20 mM	β -Glycerophosphat
1 mM	Na_3VO_4
10 mM	SAHA

Primäre Antikörperlösung

Die entsprechende Menge an primärem Antikörper (Abschnitt 4.1.3.1) wurde in 5 ml PBS-T mit 2% Magermilchpulver und 0,02% NaN_3 verdünnt.

Sekundäre Antikörperlösung

Die entsprechende Menge an sekundärem Antikörper (Abschnitt 4.1.3.2) wurde in PBS-T mit 2% Magermilchpulver verdünnt.

Sammelgelpuffer

1 M Tris/HCl; pH 6,8

SDS-Gel

Trenngel (13%)	Sammelgel	
4,1 ml	0,66 ml	Rotiphorese®Gel 30
1,9 ml	-	1 M Tris/HCl; pH 8,8
-	1,25 ml	1 M Tris/HCl; pH 6,8
4 ml	3,1 ml	ddH ₂ O
50 μ l	25 μ l	20% SDS
40 μ l	30 μ l	10% APS
4 μ l	2 μ l	TEMED

SDS-Laufpuffer (10x)

250 mM	Glycin
25 mM	Tris/HCl
0,1%	SDS

Strip-Puffer

62,5 mM	Tris/HCl; pH 6.8
2%	SDS
frisch zugeben:	
100 mM	β -ME

Saccharoselösung

2 M Saccharose in Homogenisationspuffer

Transferpuffer

200 mM	Glycin
20 mM	Tris/HCl
20%	Ethanol
0,1%	SDS

Trenngelpuffer

1 M Tris/HCl; pH 8,8

4.2 Methoden

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt. Sterile Lösungen wurden vor Gebrauch zusätzlich autoklaviert. Als Vorlage dieses Methodenteils wurde die Diplomarbeit von Dr. Dorle Hennig verwendet und einige Teile davon in veränderter Form übernommen.

4.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte in einem separaten Zellkulturraum in Inkubatoren (Sanyo) bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre und 5% CO₂. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter keimfreien Bedingungen in Sicherheitswerkbänken (HeraSafe, Heraeus) mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Das verwendete Medium, PBS und Trypsin/EDTA (1x) wurde vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (für HCT116), bzw. RPMI (für NB4) mit 10% FCS und 0,5% Gentamycin in T75 Zellkulturflaschen (Sarsted).

Ab einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen, abhängig vom ihrem Wachstum, alle 2-4 Tage vereinzelt. Dazu wurde von adhärenenten Zellen das überstehende Medium abgenommen und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden pro Zellkulturflasche 2 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde in 8 ml Kulturmedium (DMEM) aufgenommen und die Zellen durch pipettieren vereinzelt. Anschließend wurde diese Suspension in 15 ml-Röhrchen (Greiner) überführt und 5 min bei 20 °C und 700 g (Multifuge, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert. Je nach Wachstum der Zellen wurden 5-20% davon in die Zellkulturflasche zurückgeführt und mit Kulturmedium (DMEM) auf insgesamt 20 ml aufgefüllt. Die übrigen Zellen wurden für Experimente verwendet oder verworfen. Suspensionszellen wurden in 50 ml-Röhrchen (Greiner) 5 min bei 20 °C und 700 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 30 ml Kulturmedium (RPMI) resuspendiert. Davon wurden 10% zurück in eine aufrecht stehende T75 Zellkulturflasche überführt und mit Kulturmedium (RPMI) auf 30 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die übrigen Zellen wurden ebenfalls für Experimente verwendet oder verworfen.

Zur Lagerung wurde ein Teil der nicht benötigten Zellsuspension 5 min bei 20 °C und 700 g zentrifugiert und in Einfriermedium resuspendiert. Davon wurden 1,5 ml in ein Kryo-Röhrchen (Greiner) gefüllt und bei -80 °C in speziellen Kryoeinfriergeräten (Mr. Frosty, Wessington Cryogenics) schonend eingefroren. Das DMSO im Einfriermedium verhinderte zusätzlich, dass Zellmembranen platzen. Spätestens nach zwei Tagen wurden die bereits eingefrorenen Zellen bei -150 °C gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei RT unter der Sicherheitswerkbank. Die Suspension wurde direkt in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und in einem 15 ml-Röhrchen 5 min bei 20 °C 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und eine Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben.

4.2.2 Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden 24 h vor den Behandlungen in DMEM oder RPMI mit 10% FCS (Versuchsmedium) ausgesät. Vorab wurde die Zellzahl mithilfe eines *Coulter Counters* (BeckmanCoulter) automatisch oder mit einer Zählkammer manuell bestimmt. Da für die Versuche dieser Arbeit unterschiedliche Mengen an Zellmaterial benötigt wurden, sind die Experimente in verschiedenen Formaten vorbereitet worden: für MTT-Tests und die parallele Bestimmung der Zellzahl wurden je 3×10^5 Zellen in 48-well-Platten (Greiner) ausgesät; für die Durchflusszytometrie wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 12-well-Platten (Greiner) ausgesät; für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden 5×10^4 Zellen in 6-well-Platten (Greiner) ausgebracht; zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten, zur Analyse von Metaboliten durch Massenspektrometrie, für Transfektionen und zur Isolation von *Messenger Ribonucleic Acids* (mRNAs) wurden je 3×10^5 Zellen in 6-well-Platten ausgesät; um Mitochondrien zu isolieren, den Sauerstoffverbrauch zu messen und für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden je 3×10^6 Zellen in 10 cm-Schalen (Greiner) ausgesät; für die massenspektroskopische Analyse der post-translationalen Modifikationen von p53 wurden 6×10^6 Zellen in 15 cm-Schalen (Greiner) ausgesät. Die Zellen wurden entsprechend des Versuchsaufbaus 4, 8, 12, 24 und 48 h behandelt. Sofern diese Inhibitoren verwendet wurden, wurden die Zellen 1 h mit z-VAD-FMK, bzw. KU55933 vorbehandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt.

4.2.3 Transfektion humaner Zellen

Als Transfektion wird das Einschleusen fremder Plasmid-DNA in Säugerzellen bezeichnet. Sofern ein Teil der aufgenommenen DNA in den Zellkern gelangt und dort einige Zeit exprimiert wird, hat eine transiente Transfektion stattgefunden. Wird die Fremd-DNA in das Genom der Säugerzelle integriert und dauerhaft exprimiert, wird dies als stabile Transfektion bezeichnet. Die stabile Integration wird über Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen erreicht. Die Transfektionseffizienz konnte durch eine *green fluorescent protein* (GFP)-Sequenz auf dem Plasmid-Vektor, parallele Kotransfektion mit einem GFP-Plasmid oder durch anschließenden Western Blot überprüft werden.

Die verwendete Transfektionmethode beruhte darauf, dass die eingesetzte negativ geladene Plasmid-DNA an das positiv geladene Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) band und Komplexe bildete. Diese Liposome waren in der Lage mit der Zellmembran zu fusionieren, wodurch die transportierte DNA in die Zelle gelangte (Dalby *et al.*, 2004). Zur transienten Transfektion wurden die adhärennten Zellen 24 h vorher in 6-well-Platten in Transfektionsmedium ausgesät damit sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 90% konfluent waren. Zu den Zellen wurden je 3 µl Lipofectamine® 2000 in 150 µl Opti MEM I-Medium und 1 µg Plasmid-DNA in 150 µl Opti MEM I-Medium gegeben. Am folgenden wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit den entsprechenden Substanzen behandelt.

Für stabile Transfektionen wurde zusätzlich zum gewünschten DNA-Plasmid ein weiteres Plasmid kotransfiziert, dass die Sequenz für eine unspezifische *short hairpin* (sh)RNA (shCtl) und eine Puromycin-Resistenz enthielt. Puromycin ist ein Antibiotikum aus *Streptomyces alboniger* und inhibiert die ribosomale Proteintranslation von Pro- und Eukaryoten (Pestka, 1971). Der Stopp der Proteinneusynthese ist für Zellen auf Dauer toxisch. Die transfizierten Zellen standen in der Gegenwart von Puromycin unter starkem Selektionsdruck und waren gezwungen die Fremd-DNA dauerhaft in ihr eigenes Genom zu integrieren. Im Idealfall wurde dabei nicht nur die Puromycin-

Resistenz, sondern auch die gewünschte Ziel-DNA mit im Genom integriert. Die adhärenenten Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 6-well-Platten in Transfektionsmedium ausgesät und waren zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 90% konfluent. Zu den Zellen wurden je 3 µl Lipofectamine® 2000 in 150 µl Opti MEM I-Medium und 1 µg Plasmid-DNA mit 0,1 oder 0,2 µg shCtl Plasmid-DNA in 150 µl Opti MEM I-Medium gegeben. Am folgenden Tag wurden in das Medium 0,1 oder 0,2 µg/ml Puromycin pipettiert. Zur Optimierung wurden zwei verschiedene Konzentrationen an shCtl, bzw. Puromycin verwendet. Allerdings zeigte sich, dass unter allen Bedingungen stabil transfizierte Zellen erhalten wurden. Alle 2-3 Tage wurde das Medium durch frisches Transfektionsmedium mit 0,1 oder 0,2 µg/ml Puromycin ersetzt. Nach 2 Wochen konnten die Zellen das erste Mal vereinzelt werden und die Puromycinkonzentration wurde auf 1 µg/ml für alle Zellen erhöht. Alle 2-3 Tage wurde das Medium weiterhin durch frisches Transfektionsmedium mit 1 µg/ml Puromycin ersetzt und die Zellen gegebenenfalls vereinzelt. Nach weiteren 2 Wochen wurden die Zellen in T25 Zellkulturflaschen ausgesät und für weitere 2 Woche mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. Nach insgesamt 6 Wochen Selektion waren die Zellen stabil transfiziert. Dies wurde anhand von GFP-Fluoreszenz und Western Blot überprüft. Es wurde pro Transfektion eine gemischte Kultur weiter verwendet und kein Einzelklon ausgewählt und vermehrt. Die stabil transfizierten Zellen konnten danach in Versuchsmedium ohne Puromycin ausgesät und für Experimente verwendet werden. Alle nicht benötigten Zellen wurden bei -150 °C eingefroren.

4.2.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Um die Aktivität von Proteasen zu vermindern, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und behandelt. Danach wurden sie mithilfe eines Gummischabers vom Boden der Platte gelöst und mit dem überstehenden Medium in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die abgelösten Zellen wurden 5 min bei 4 °C und 2000 rpm (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl RIPA-Puffer gelöst und durch Ultraschall lysiert (20% Intensität, 0,3 s Puls, 0,6 s Pause, Dauer 11 s; Sonifier WD-250, Branson). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min, 4 °C) entfernt. Die Lysate wurden entweder direkt weiter verarbeitet, kurzfristig bei -20 °C oder langfristig bei -80 °C gelagert.

4.2.5 Isolation von Mitochondrien aus adhärenenten Zellen

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das verwendete Protokoll wurde nach Graham (2001) modifiziert. Die zuvor in 10 cm-Schalen ausgesät und behandelten Zellen wurden mithilfe eines Gummischabers vom Boden der Platte gelöst. Danach wurden die Zellen mit dem überstehenden Medium in 15 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 20 °C und 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in seinem 5-fachen Volumen Homogenisationspuffer gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Die angeschwollenen Zellen wurden durch 15 Züge in einem *Dounce* Homogenisator (Sigma Aldrich) aufgeschlossen und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch diese Aufarbeitung wurden nur die Zellmembranen zerstört, die Mitochondrien blieben jedoch intakt. Zur Zellsuspension

wurde ein 1-faches Pelletvolumen 2 M Saccharoselösung (Endkonzentration (EK): 0,25 M) pipettiert und vermischt. Durch differentielle Zentrifugation (5 min, 4 °C, 1000 g) wurden die schweren Kerne und Zellmembranfragmente pelletiert, die leichteren Mitochondrien und die zytosolischen Proteine verblieben jedoch in Lösung. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die differentielle Zentrifugation wiederholt. Danach wurde der Überstand in einem frischen Reaktionsgefäß für 10 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert um die Mitochondrien zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und aufgehoben. Er enthielt die zytosolische Fraktion. Die Mitochondrien wurden in 1/10 Volumen des Zytosols an Homogenisationspuffer aufgenommen und durch Ultraschall lysiert (20% Intensität, 0,3 s Puls, 0,6 s Pause, Dauer 11 s) oder weiter fraktioniert. Die Lysate wurden entweder direkt weiter verarbeitet, kurzfristig bei -20 °C oder langfristig bei -80 °C gelagert.

4.2.6 Mitochondriale Fraktionierung durch Natriumcarbonat-Behandlung

Um isolierte Mitochondrien weiter in Membranen und Matrix aufzutrennen wurden diese nach Fujiki *et al.* (1982 a und b) mit Natriumcarbonat behandelt. Durch den hohen pH-Wert der Lösung bildeten sich Poren in den mitochondrialen Membranen und die Bestandteile der Matrix konnten in die Lösung diffundieren. Das mitochondriale Pellet aus Abschnitt 4.2.5 wurde dazu in 50 µl Na₂CO₃-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 15 min bei 4 °C und 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und der pH-Wert mit 1 M HCl neutralisiert. Im Überstand waren nun alle Komponenten der mitochondrialen Matrix enthalten. Das Membran-Pellet wurde in 50 µl Homogenisationspuffer gelöst. Die Lysate wurden entweder direkt weiter verarbeitet, kurzfristig bei -20 °C oder langfristig bei -80 °C gelagert.

4.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach (Bradford, 1976) mit Coomassie Brilliant Blue G-250 durchgeführt. Die kommerzielle Färbelösung (Roti® Nanoquant) musste vorab 1:5 mit ddH₂O verdünnt werden. Zu Bestimmung wurden je 2 µl der Proben in die Vertiefungen einer 96-well-Platte (Greiner) pipettiert und mit je 198 µl der gebrauchsfertigen Färbelösung vermengt. Zusätzlich wurde mit 0, 2, 4, 6, 8 und 12 µg BSA in Färbelösung eine Eichgerade erstellt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption der Proben und der Eichgerade bei 595 nm in einem Plattenphotometer (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) bestimmt. Anhand der Eichgerade konnte der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt werden. Die Bestimmungen fanden immer als Duplikate statt.

4.2.8 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine der Gesamtzellextrakte oder Mitochondrienisolationen und -fraktionierungen genauer zu untersuchen, wurden diese mithilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach deren Molmasse getrennt (Laemmli, 1970). Durch die Anlagerung von SDS an das Proteinrückgrat der Proteine und den Einsatz von reduzierendem β-ME im Laemmli-Proben-Puffer lagen die Proteine einheitlich negativ geladen und entfalten vor. Dadurch war für die Auftrennung im Gel nur die Länge der Aminosäurekette, bzw. die Masse des Proteins entscheidend. Die Gele

bestanden aus einem Trenngel (Tris/HCl, pH 8,8; 13% Acrylamid) mit einem überschichteten Sammelgel (Tris/HCl, pH 6,8; 3-5% Acrylamid) und wurden mit Hilfe des Mini-PROTEAN® 3 System (Bio-Rad) gegossen. Die Proben wurden vorab mit 6x Laemmli-Proben-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurden in jede Geltasche 10-50 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit dem Mini-PROTEAN® 3 System in 1x SDS-Laufpuffer bei konstant 130 V für etwa 1 h und 15 min.

4.2.9 Western Blot und Immundetektion von Zielproteinen

Eine Möglichkeit Proteine spezifisch nachzuweisen ist die Immundetektion. Dazu wurden die Proteine aus der vorangegangenen SDS-PAGE auf einer Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Roti-PVDF) gebunden. Der elektrophoretische Transfer erfolgte vom SDS-Gel auf die Membran bei 150 mA/Membran für 2 h oder 20 mA/Membran über Nacht in einem Tank-Blot System (Mini-PROTEAN® 3) gefüllt mit Transferpuffer. Dabei waren das Gel und die Membran als Stapel zwischen je zwei Filterpapieren (3 mm Blotting Paper, Whatman®) und Schwämmen in der Blotkammer eingespannt. Danach wurden alle weiteren freien Bindestellen auf der PVDF-Membran durch 1 h Inkubation bei RT in Blockierungspuffer besetzt und unspezifische Bindungen der primären Antikörper damit vermindert. Die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht auf einem Rollmischgerät (RM-5, Ingenieurbüro CAT). Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min bei RT in PBS-T gewaschen und danach für 1 h bei RT mit einem Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membrane erneut dreimal 10 min bei RT in PBS-T gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran mit einer ECL-Lösung bedeckt. Die am Sekundärantikörper gebundene HRP setzte dabei Wasserstoffperoxid um und führte so zu Chemilumineszenz. Diese wurde durch Röntgenfilme (Fuji Super RX, Fujifilm) detektiert. Je nach Signalstärke variierte die Expositionsdauer zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten. Die belichteten Filme wurden in einem Dunkelraum mit einer automatischen Entwickler-Maschine (OPTIMAX, PROTEC®) entwickelt. Abschließend wurden die Filme mit einem Scanner (Epson® Perfection V500 Photo) und der dazugehörigen Software digitalisiert. Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden mit Adobe® Photoshop® CS3 zusammengestellt.

Sofern mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern (LiCor Biotechnologies) gearbeitet wurde, mussten Nitrozellulose-Membranen anstelle der PVDF-Membranen verwendet werden und es wurde keine ECL-Lösung benötigt. Die Fluoreszenzmessung fand in einem LiCor Odyssey *Infrared Scanner* (LiCor Biotechnologies) statt. Die Quantifizierung der Signalstärke wurde direkt mit der Gerätesoftware durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Nach der Entwicklung wurde die Membran kurz in PBS-T gewaschen und je nach Signalstärke des primären Antikörpers direkt für die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper verwendet oder kurz gestrippt. Zum strippen wurde die Membran 15 min bei RT in einem 50 ml-Röhrchen in Strip-Puffer auf einem Rollmischgerätgerät inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min bei RT mit ddH₂O gewaschen und anschließend erneut 1 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Durch das Strippen wurden gebundene Antikörper, aber auch Teile an der Membran der gebundenen Proteine

entfernt. Nach der Blockierung wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in einem weiteren Primärantikörper inkubiert und wie zuvor beschrieben entwickelt.

4.2.10 Quantitative *real-time polymerase chain reaction*

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) ist ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt die Amplifikation, die PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert. Die erhaltenen Messdaten können im Anschluss direkt quantifiziert werden und unterschiedliche Genexpressionen zwischen verschiedenen Behandlungen bestimmt werden.

Die zelluläre RNA wurde mittels peqGOLD RNAPure™ isoliert. Vorbereitend wurden alle Arbeitsflächen und -geräte mit 70%igem Ethanol gereinigt um RNasen zu inaktivieren. Von den zuvor in 6-well-Platten ausgesäten und behandelten adhären Zellen wurde das überstehende Medium abgenommen. Pro Vertiefung der 6-well-Platte wurde 1 ml der peqGOLD RNAPure™-Lösung hinzugegeben und die Zellen darin durch pipettieren lysiert. Die Suspensionen wurden in frische, sterile Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden zu den Proben je 200 µl Chloroform hinzugegeben. Diese wurden anschließend durch vortexen gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die inhomogenen Suspensionen wurden 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Dabei kam es zur Phasentrennung in eine obere wässrige Phase und eine untere phenolische Phase. Die obere Phase, in der sich die RNA befand, wurde in frische, sterile und RNase-freie Reaktionsgefäße überführt, mit 450 µl Isopropanol vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die untere Phase, in der sich die DNA und Proteine befanden, wurde verworfen. Um die RNA zu sedimentieren wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gelartige RNA-Pellet wurde zweimal mit je 500 µl 75%igem Ethanol (unvergällt) gewaschen (10 min bei 4 °C und 12.000 g). Schließlich wurde das RNA-Pellet in 40 µl DEPC-Wasser gelöst und ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurden zu den Proben je 5 µl DNase I (1 U/µl, RNA-frei, Thermo Scientific) und je 5 µl 10x *reaction buffer* (mit MgCl₂, Thermo Scientific) pipettiert und 30 min bei 37 °C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) unter schütteln inkubiert. Danach wurden zu den Ansätzen je 5 µl 50 mM EDTA-Lösung (Thermo Scientific) hinzu gegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert um die DNase zu inaktivieren. Abschließend wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit mittels NanoDrop® (ND-1000, Thermo Scientific) bestimmt.

Die reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR wurden von Dr. Jürgen Sonnemann (Kinderklinik, Universitätsklinikum Jena) und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt.

4.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle und einfache Methode um mehrere Zellparameter zu bestimmen. Das Prinzip eines *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Geräts basiert auf der Erfassung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel und Zellen. Diese werden mit einem Laser bestrahlt. Farbstoffe können mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt und deren Emission bei der entsprechenden Wellenlänge detektiert werden.

Zellen können mit Farbstoffen oder durch Farbstoff-gekoppelte Antikörper markiert werden, wobei mehrere Farbstoffe parallel gemessen werden können und somit eine Reihe von Parametern gleichzeitig bestimmt werden können.

Parallele Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und Zelltods

Mit dieser Methode wurde bestimmt, wie viele Zellen Anzeichen von Apoptose zeigten oder bereits tot waren. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) ist ein Anzeichen früher Apoptose (Métivier *et al.*, 1998; Ozgen *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde dazu der zellpermeable Farbstoff 3'-Dihexyloxacarcocyaniniodid ($\text{DiOC}_6(3)$) verwendet. Parallel wurde anhand der Aufnahme von Propidiumiodid (PI) der Anteil toter Zellen bestimmt. PI ist nicht zellpermeabel und wird nur in vollständig apoptotische oder nekrotische Zellen mit defekten Zellmembranen aufgenommen (Nicoletti *et al.*, 1991; Sgonc und Gruber, 1998; Vermes *et al.*, 2000). Beide Farbstoffe konnten parallel gemessen werden, da ihre Spektren nur minimal überlappen und dies durch Kompensation am FACS-Gerät reduziert wurde. Bevor die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet wurden, wurden sie 30 min mit 50 nM $\text{DiOC}_6(3)$ in DMEM bei 37 °C inkubiert. Von den adhären Zellen wurde das Medium abgenommen und in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Die Zellen wurden einmal mit 500 μl PBS gewaschen und danach mit 250 μl Accutase 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 1 ml PBS zu den abgelösten Zellen gegeben und diese durch pipettieren in der Lösung vereinzelt und zum Medium in die FACS-Röhrchen überführt. Die Suspensionen wurden 5 min bei 20 °C und 700 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 ml PBS mit 15 $\mu\text{g/ml}$ PI resuspendiert und die Proben direkt an einem BD FACSCantoTM I (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) gemessen. Zur Analyse wurden 10^4 Zellen gemessen und Zellfragmente durch *Gates* ausgeschlossen. Anhand von Histogrammen oder *Dot-Plots* konnte der Anteil an PI-positiven Zellen, bzw. der Verlust von $\Delta\Psi_M$ bestimmt werden. Bei beiden Färbungen bildeten sich zwei getrennte Populationen zwischen intakten und geschädigten Zellen.

Messung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) sind häufig die Folge von Änderungen im Zellstoffwechsel oder von Stressreizen. Die Menge der ROS wurde in den Versuchen mit 2',7'-dichlorofluoresceindiacetat (DCFDA) (Eruslanov und Kusmartsev, 2010; Royall und Ischiropoulos, 1993) bestimmt. Bevor die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet wurden, wurden sie 30 min mit 20 μM DCFDA in DMEM bei 37 °C inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung verlief analog zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und Zelltods. Schließlich wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Proben direkt an einem BD FACSCantoTM I gemessen. Zur Analyse wurden 10^4 Zellen gemessen und Zellfragmente durch *Gates* ausgeschlossen. Die Menge an ROS war direkt proportional zu der gemessenen Fluoreszenzintensität und konnte darüber quantifiziert werden.

Bestimmung der Autophagie

Der Prozess der Autophagie entfernt defekte Proteine und Organellen aus Zellen um weitere Schäden zu verringern (Mammucari und Rizzuto, 2010; Munoz-Gamez *et al.*, 2009; Gerwitz, 2013). Die Menge an Autophagie wurde mit dem Cyto-ID® *Autophagy detection kit* (Chan *et al.*, 2012) bestimmt. Bevor die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet wurden, wurden sie 30 min mit 0,5 µl Cyto-ID-Farbstoff in 1 ml DMEM bei 37 °C inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung verlief analog zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und Zelltods. Schließlich wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Proben direkt an einem BD FACSCanto™ I gemessen. Zur Analyse wurden 10⁴ Zellen gemessen und Zellfragmente durch *Gates* ausgeschlossen. Die Menge der Autophagie war direkt proportional zu der gemessenen Fluoreszenzintensität und konnte darüber quantifiziert werden.

4.2.12 MTT-Test mit paralleler Zellzahlbestimmung

Der MTT-Test beruht darauf, dass der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von Zellen in ein wasserunlösliches, violettes Formazan umgewandelt wird. Das MTT wird durch die Reaktion der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase (Denizot und Lang, 1986), aber auch durch hohe zytoplasmische Nicotinamiddinukleotid (NADH)-Mengen umgesetzt (Berridge und Tan, 1993). Damit gibt der MTT-Test nicht nur eine Aussage über das Wachstum von Zellen, sondern auch über deren Stoffwechsel. Der Test wird häufig verwendet um die Toxizität verschiedener Substanzen zu testen (Mosmann, 1983; Yamaue *et al.*, 1991). Die Zellen wurden in 48-well-Platten ausgesät. In das überstehende DMEM wurde unter der Sicherheitswerkbank 0,5 mg/ml (EK) MTT gegeben und für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das überstehende Medium von den Zellen abgenommen und je 400 µl Isopropanol pro Vertiefung der 48-well-Platte gegeben. Die Platte wurde nun 15 min geschwenkt. Der gebildete wasserunlösliche Farbstoff löste sich dadurch im Isopropanol aus den Zellen heraus. Von den Isopropanol-Lösungen wurden je 100 µl in eine 96-well-ELISA-Platte überführt. Die Färbung wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 596 nm in einem Plattenphotometer gemessen.

Parallel dazu wurden die Zellen einer identisch behandelten 48-well-Platte 10 min bei RT mit je 100 µl Trypsin/EDTA inkubiert. Danach wurden 400 µl PBS zugegeben und die Zellen durch pipettieren vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl dieser Suspensionen mithilfe eines *Coulter Counters* bestimmt. Um den rein metabolischen Aspekt des MTT-Tests zu untersuchen wurde der MTT-Umsatz pro Zellzahl berechnet. Die MTT-Tests und die Zellzahlbestimmungen wurden jeweils als Triplikate ausgesät und gemessen.

4.2.13 Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs

Ein Großteil der zellulären ATP-Menge wird durch die oxidative Phosphorylierung gewonnen. Der Umsatz von Sauerstoff zu Kohlendioxid spielt dabei eine zentrale Rolle. Um den Sauerstoffverbrauch adhärenter Zellen zu messen wurde eine Clark Elektrode (Clark *et al.*, 1953; Li und Graham, 2012) verwendet. Vor jeder Messung wurde die Elektrode neu kalibriert und äquilibriert. Die Zellen wurden in 10 cm-Schalen ausgesät und behandelt. Anschließend wurde das überstehende

Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml 0,5x Trypsin/EDTA (mit PBS verdünnt) auf die Zellen gegeben und diese für 5 min bei 37 °C inkubiert. Dazu wurden 5 ml Versuchsmedium hinzugegeben und die Zellen durch pipettieren vereinzelt. Von dieser Suspension wurden 4 ml in einem 50 ml-Röhrchen mit 6 ml Versuchsmedium weiter verdünnt und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Die Zellen wurden danach 3 min bei 1200 g und RT (Eppendorf) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellett in der entsprechenden Menge DMEM gelöst, dass sich eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml ergab. Aus dieser Suspension wurde 1 ml entnommen in die Kammer der Clark Elektrode (Oxygraph system, Hansatech Instruments) gegeben und diese luftdicht verschlossen. Der Sauerstoffverbrauch wurde in einem Zeitintervall von 5 min aufgezeichnet und die Rate an verbrauchtem Sauerstoff pro Minute mit der Software System Oxygraph Plus V1.01 berechnet. Nach jeder Messung wurde die Elektrode zweimal mit DMEM gespült und für 5 min äquilibriert.

Von Suspensionszellen wurde zuerst die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 3 min bei 1200 g und RT sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellett in der entsprechenden Menge RPMI gelöst, dass sich eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml ergab. Die Messung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Die Clark Elektrode und Teile des Verbrauchsmaterials wurden freundlicherweise vom Lehrstuhl für Humanernährung (Friedrich-Schiller-Universität, Jena) zur Verfügung gestellt.

4.2.14 Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopie ist ein Verfahren um ein Molekülgemisch nach dessen Masse zu trennen. Das Verhältnis von Masse pro Ladung (m/z) ist dabei entscheidend. Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts wurden die ersten Massenspektroskope entwickelt. Seitdem haben sich mehrere Verfahren entwickelt um Stoffe und deren Moleküle zu ionisieren und zu untersuchen. Am bekanntesten sind dabei die *electron spray ionisation* (ESI) und *matrix assisted laser desorption* (MALDI) Verfahren. Bei ESI wird ein Stoffgemisch durch eine spannungsgeladene Kapillare geleitet. Dadurch wird das Gemisch versprüht und die einzelnen Moleküle geladen. Bei MALDI wird ein festes Gemisch durch einen Laser verdampft und dadurch ionisiert. Die ionisierten Teilchen werden bei allen Methoden in einem elektromagnetischen Feld beschleunigt und getrennt. Durch vorhergehende Chromatographien, z.B. Gaschromatographie oder Flüssigphasenchromatographie kann ein Stoffgemisch bereits vor der Massenspektroskopie in einzelne Bestandteile getrennt werden. Dies erleichtert die spätere Auswertung der gemessenen Spektren (Mann und Kelleher, 2008; Karas und Hillenkamp, 1988; Fenn *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 2003).

Alle Experimente wurden im Rahmen eines dreimonatigen Auslandsaufenthalts im Beatson *Institute for Cancer Research* (Glasgow, UK) durchgeführt. Die Zellkultivierung und Probenvorbereitung wurde vor Ort von mir durchgeführt. Alle verwendeten Materialien, Puffer und Lösungen wurden zur Verfügung gestellt. Die anschließenden Analysen der Proben wurden zum Teil von Wissenschaftlern der Massenspektroskopieabteilung des Beatson Institutes übernommen.

Stoffwechselanalyse

In diesem Experiment wurden durch Massenspektroskopie verschiedene Nährstoffe und Stoffwechselzwischenprodukte untersucht. Dabei wurde sowohl das überstehende Kulturmedium nach 12 bzw. 24 h Behandlung, als auch Zellextrakte untersucht. Ausgehend von der Zusammensetzung im Kulturmedium wurde nach der Messung für jeden Zeitpunkt und jede Behandlung der Verbrauch oder die Sekretion bestimmter Metabolite im Medium berechnet. Die intrazellulären Stoffwechselzwischenprodukte in den Behandlungen wurden mit den Mengen der jeweiligen Kontrolle verglichen.

Die in 6-well-Platten ausgesäten Zellen wurden für 12 und 24 h behandelt. Für jede Behandlung wurden die Zellen 5-fach ausgesät. Zwei Ansätze wurden zur Zellzahlbestimmung genutzt und drei zur Stoffwechselanalyse. Nach erfolgter Behandlung wurden aus den Ansätzen je 10 µl des Kulturmediums entnommen und mit 490 µl MS-Lysepuffer vermischt. Als Kontrolle wurde von frischem Kulturmedium dreimal 10 µl entnommen und ebenfalls mit 490 µl MS-Lysepuffer vermischt. Die Gemische wurden in Glasphiolen für die Massenspektroskopie überführt, versiegelt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Danach wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde von den Zellen das Medium abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin/EDTA für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 µl PBS dazu gegeben und die Zellen darin durch pipettieren vereinzelt. Die Zellzahl wurde an einem Casy® *Cell Counter* (Casy Modell TT, Innovatis) bestimmt. Anhand der gemessenen Werte wurde die entsprechende Menge MS-Lysepuffer für die Stoffwechselanalyse berechnet. Dies war nötig, da die Behandlungen die Zellproliferation stark beeinflusste. Damit die einzelnen Proben vergleichbar waren, sollten 2×10^6 Zellen/ml in jedem Ansatz enthalten sein. Schließlich wurden die Proben für die Metabolitanalyse vorbereitet. Von den Zellen wurde das überstehende Medium entfernt und sie wurden einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde zu jedem Ansatz die berechnete Menge an MS-Lysepuffer gegeben. Die Zellen wurden mit einem Schaber darin gelöst und durch pipettieren aufgeschlossen. Von diesem Lysat wurden je 1 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 4 °C geschüttelt (Thermomixer comfort, Eppendorf). Danach wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde in Glasphiolen für die Massenspektroskopie überführt, versiegelt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Die Messungen wurden von Gillian M. Mackay (Beatson *Institute for Cancer Research*, Glasgow, UK) wie in Maddocks *et al.*, (2013) und Labuschagne *et al.*, (2014) beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Datensätze von mir ausgewertet.

Analyse post-translationaler Modifikationen von p53

Die Massenspektroskopie wird häufig zu Proteinanalyse herangezogen und es können auch post-translationalen Modifikationen einzelner Proteine nachgewiesen werden (Mann und Jensen, 2003). In diesem Experiment wurden die post-translationalen Modifikationen von p53 nach genotoxischem Stress untersucht. Durch eine Immunopräzipitation (IP) wurde p53 aus Zellextrakten angereichert um die Massenspektroskopie zu ermöglichen.

Vorbereitend wurden zwei gegen p53 gerichtete primäre Antikörper (Bp53-12 und DO-1, Santa Cruz Biotechnologies) an magnetische Dynabeads® (Protein G) gekoppelt. Die Antikörper waren gegen unterschiedliche Epitope in p53 gerichtet. Durch die Kombination wurde die Effizienz der IP gesteigert. Von den magnetischen *beads* wurden 50 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und mithilfe eines Magneten (Life technologies) der Überstand entfernt. Dazu wurden 600 µl PBS-T und 50 µl der 50:50 Antikörpermischung (Bp53-12 und DO-1) gegeben. Die Suspension wurde für 2 h bei 4 °C auf einem Rotationsrührwerk (Rotator SB3, Stuart) rotiert. Danach wurden mithilfe eines Magneten der Überstand abgenommen und die Antikörper-gebundenen *beads* einmal mit 600 µl PBS-T und zweimal mit 600 µl Konjugationspuffer (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl; pH 8) gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper-gebundenen *beads* 30 min bei RT in Konjugationspuffer mit 2 mg Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) inkubiert und quervernetzt. Nach Zugabe von 37,5 µl *quenching buffer* (Tris/HCl; pH 7,5) wurde der Ansatz für weitere 15 min bei RT rotiert. Schließlich wurde das *bead*-Antikörper-Konjugat dreimal mit je 600 µl PBS-T gewaschen. Die *beads* wurden in 50 µl PBS-T resuspendiert und danach bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die IP wurden die Zellen in 15 cm-Platten ausgesät und behandelt. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es wurden 700 µl IP-Lysepuffer pro Platte zugegeben, die Zellen darin mit einem Schaber abgelöst und durch pipettieren suspendiert. Diese Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Ultraschall lysiert (2x 15 s Pulse, 40% Amplitude mit 2 s Pause dazwischen). Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und 20 µl davon als *Input* bei -20 °C gelagert. Zu jedem Ansatz wurden 50 µl *bead*-Antikörper-Konjugat gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationsrührwerk rotiert. Am folgenden Tag wurde mit einem Magneten der Überstand abgenommen und die *beads* zweimal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Danach wurden die *beads* noch einmal mit Hoch-Salz-Puffer und dreimal mit PBS-T gewaschen. Zur Elution wurden die *beads* in 50 µl 1x NuPAGE® LDS Probenpuffer (mit ddH₂O verdünnt, ohne β-ME) und 10 min bei 99 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt erhitzt. Mit einem Magneten wurden der Überstand von den *beads* entfernt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die *beads* wurden verworfen. Zum Überstand wurde 20 mM (EK) DTT gegeben und der Ansatz für weitere 10 min bei 99 °C inkubiert. Die Proben wurden auf SDS-Gele (NuPAGE® Bis-Tris *Pre-Cast gels*, 4-12% Gradientengel) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Proteine im Gel wurden durch eine Coomassie-Färbung (Instantblue, Expedeon) sichtbar gemacht.

Die weitere Probenvorbereitung, die Messung und die Auswertung wurden von Sergio Lilla (Beatson *Institute for Cancer Research*, Glasgow, UK) durchgeführt.

4.2.15 Elektronenmikroskopie

Die ersten Elektronenmikroskope wurden in den 1930er Jahren entwickelt und bereits Mitte des letzten Jahrhunderts konnten mit ihnen detailreiche Bilder von Organismen oder Oberflächenstrukturen aufgenommen werden. Als wichtige Grundtypen werden Raster- und Transmissionselektronenmikroskope unterschieden. Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden Oberflächen mit einem Elektronenstrahl abgetastet. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) hingegen werden Dünnschnitte von Gewebeproben mit

einem Elektronenstrahl durchdrungen und analysiert. Bis heute bietet die TEM eine deutlich höhere maximale Auflösung als Lichtmikroskope. Damit wurden Strukturen mit einer Auflösung von bis zu 3,3 Å gemessen (Harris, 2014; Knott und Genoud, 2013).

Die gesamte Rasterelektronenmikroskopie wurde von PD Dr. Martin Westermann (EMZ, Universitätsklinikum Jena) und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Zellkultivierung und -fixierung wurde von mir durchgeführt. Die dazu benötigten Puffer und Lösungen wurden von PD Dr. Martin Westermann zur Verfügung gestellt.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Zellen wurden in 6-well-Platten auf 12 mm Deckgläschen ausgesät und behandelt. Zur Fixierung wurde eine 2,5%ige Glutaraldehydlösung aus Cacodylat-Puffer (100 mM Natriumcacodylat; pH 7,5) und 25%igem Glutaraldehyd (GA) hergestellt. Danach wurde von den Zellen das Medium abgenommen und diese einmal mit PBS gewaschen. Pro Vertiefung der 6-well-Platte wurde 1 ml 2,5%ige GA-Lösung hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die GA-Lösung abgenommen, je 1 ml Cacodylatpuffer auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden in eine frische 6-well-Platte eingebettet und weitere 15 min in je 1 ml Cacodylatpuffer bei RT inkubiert. Dann wurde der Puffer entfernt und durch frischen Cacodylatpuffer ersetzt. Darin wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Alle weiteren Schritte wurden von PD Dr. Martin Westermann (EMZ, Universitätsklinikum Jena) und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die Zellen wurden in 10 cm-Platten ausgesät und behandelt. Zur Fixierung wurde wie zuvor eine 2,5%ige Glutaraldehydlösung hergestellt. Danach wurde von den Zellen das Medium abgenommen und diese einmal mit PBS gewaschen. Pro 10 cm-Platte wurde 5 ml 2,5%ige GA-Lösung hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die GA-Lösung abgenommen, je 1 ml Cacodylatpuffer auf die Zellen gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Der Schritt wurde einmal wiederholt. Dann wurde der Puffer entfernt und durch frischen Cacodylatpuffer ersetzt. Darin wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Alle weiteren Schritte wurden von PD Dr. Martin Westermann (EMZ, Universitätsklinikum Jena) und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt.

5 Ergebnisse

Diese Dissertation sollte zeigen, welche Folgen eine DNA-schädigende Chemotherapie auf die Vitalität von Tumorzellen hat. Dabei standen zwei Bereiche im Hauptfokus der Arbeit: Zum Einen die Induktion von Apoptose und zum Anderen Änderungen des zellulären Metabolismus infolge des genotoxischen Stresses. Durch die Kombination mit Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi) sollten Effekte verstärkt und die Therapie effizienter gemacht werden. Vor allem p53-abhängige Effekte sollten durch eine erhöhte Acetylierung des Proteins und damit einhergehenden Aktivierung verstärkt werden. Als Testsystem wurden HCT116 Zellen mit wildtypischem p53 (p53wt) und deletiertem p53 (p53^{-/-}) gewählt und vorab mehrere Kombinationen aus DNA-schädigenden Chemotherapeutika und HDACi getestet (Daten nicht gezeigt). Die Kombination aus Irinotecan (CPT-11) und Entinostat (MS-275) zeigte dabei deutliche p53-abhängige Effekte und wurde für die weiteren Versuche gewählt. CPT-11 ist ein Derivat des natürlich vorkommenden Camptothecin und inhibiert Topoisomerasen vom Typ 1, wodurch es zu Doppelstrangbrüchen und DNA-Schäden kommt (Pommier, 2009). MS-275 ist ein Klasse I HDACi und inhibiert spezifisch die HDAC 1, 2 und 3 (Hess-Stumpp *et al.*, 2007). Dadurch kommt es einerseits zu Veränderungen im Chromatin, andererseits aber auch zu einer erhöhten Acetylierung anderer Proteine, wie beispielsweise p53. Auf den folgenden Seiten wurden die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammengestellt.

5.1 P53-abhängige Induktion des mitochondrialen Apoptose-Weges

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern jede der beiden HCT116 Zelllinien auf die kombinierte Therapie mit Irinotecan und Entinostat reagieren würde. Es sollte geklärt werden ob die Toxizität von CPT-11 durch MS-275 verstärkt werden konnte und ob post-translationalen Modifikationen an p53 eine Rolle dafür spielten.

5.1.1 Die Kombination aus Irinotecan und Entinostat führte zu p53-abhängigem Zelltod und Apoptose-Induktion in HCT116 Zellen

Mitochondrien sind sowohl für den zellulären Metabolismus essenziell, initiieren aber auch den intrinsischen Apoptose-Weg nach andauernden Stressreizen. Ein Zeichen für defekte Mitochondrien und frühe Apoptose ist der Verlust des mitochondrialen

Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) (Métivier *et al.*, 1998; Özgen *et al.*, 2000). Ein Verlust von $\Delta\Psi_M$ kann auch in noch intakten Zellen vorkommen. Daher sind die Werte für den Verlust von $\Delta\Psi_M$ höher im Vergleich zur Zelltod-Messung, welche die Zahl vollständig apoptotischer und nekrotischer Zellen angibt (Nicoletti *et al.*, 1991; Sgonc und Gruber, 1998; Vermes *et al.*, 2000). Die Behandlung beider HCT116 Zelllinien für 4 oder 8 h mit Irinotecan alleine und in Kombination mit Entinostat hatte keine Auswirkung auf das mitochondriale Membranpotential oder auf den Zelltod (Anhang. Abb. A.1). P53 wurde allerdings bereits nach 4 h Behandlung mit 10 μ M CPT-11 alleine und in Kombination mit 2 μ M MS-275 stark post-translational modifiziert und aktiviert. Selbst nach 24 h Behandlung konnte in keiner der beiden HCT116 Zelllinien eine deutliche Zunahme des Zelltods oder Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen werden (Abb. 1 A und B). Jedoch zeigte sich nach 48 h Behandlung, dass die Kombination aus CPT-11 mit MS-275 in HCT116 p53wt Zellen zu 70% Verlust des $\Delta\Psi_M$ und zu 51% Zelltod führte (Abb. 1 C und D). Die Einzelbehandlungen mit CPT-11 oder MS-275 führten nur zu 19% Verlust des $\Delta\Psi_M$ und zu 15% Zelltod für CPT-11, bzw. zu 18% Verlust des $\Delta\Psi_M$ und zu 12% Zelltod für MS-275. Der Unterschied zwischen der Kombination aus CPT-11 und MS-275 und der Kontrolle war hoch signifikant (p -Wert $< 0,001$ Verlust des $\Delta\Psi_M$; $< 0,01$ Zelltod), ebenso wie der Unterschied zwischen der Kombination und den Einzelbehandlungen (p -Werte $< 0,01$ Verlust des $\Delta\Psi_M$ und Zelltod). In den HCT116 p53-/- Zellen führte die Kombination nach 48 h Behandlungszeit lediglich zu 22% Verlust des $\Delta\Psi_M$ und zu 21% Zelltod. Verglichen mit den HCT116 p53wt Zellen war dies signifikant weniger (p -Wert $< 0,01$ Verlust des $\Delta\Psi_M$; $< 0,05$ Zelltod). Die Werte der Einzelbehandlungen waren mit 16% Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und 12% Zelltod für CPT-11, bzw. 10% Verlust des $\Delta\Psi_M$ und 7% Zelltod für MS-275 entsprechend niedriger im Vergleich zu den HCT116 p53wt Zellen. Beide Zelllinien reagierten auf die verschiedenen Chemotherapien und zeigten einen verstärkten Effekt nach kombinierter Behandlung von CPT-11 und MS-275. Allerdings wurde deutlich, dass p53 eine wichtige Funktion für die Apoptose-Induktion spielte. Dabei legte dieser Versuch auch nahe, dass post-translationale Modifikationen von p53 bedeutend für den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials waren. Der Zelltod und die mitochondrialen Schäden durch p53 traten erst nach einiger Zeit in den HCT116 Zellen auf und können die Folgen andauernden Schadens sein.

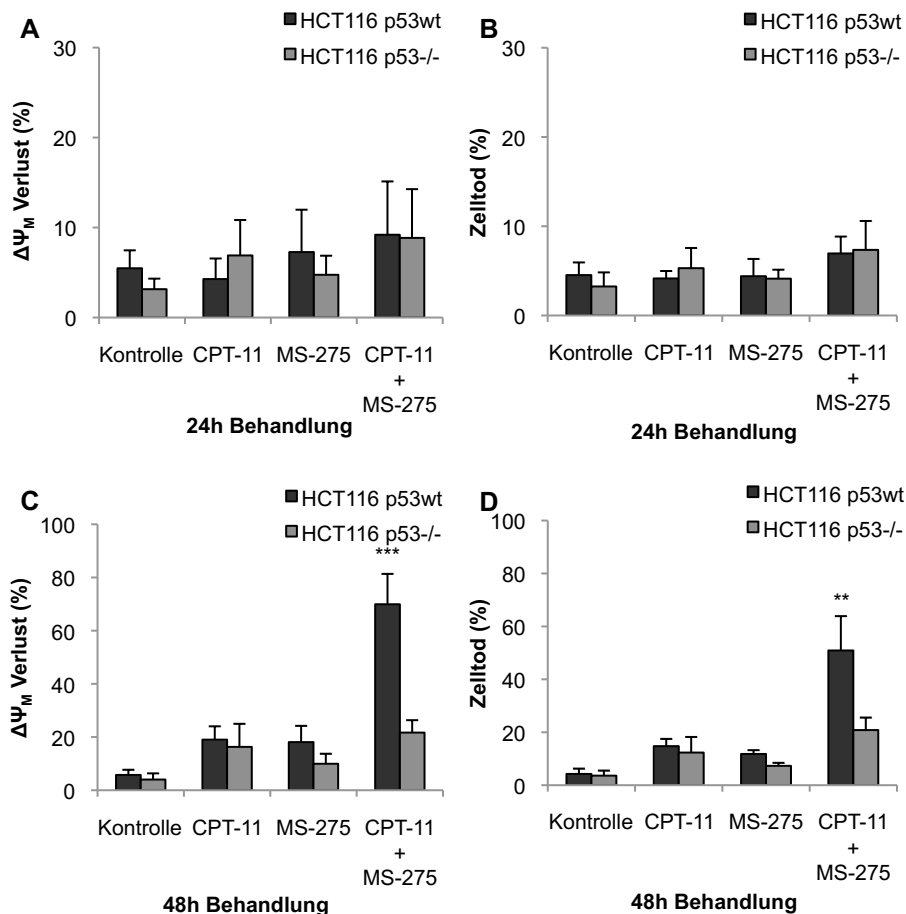


Abbildung 5.1: Die Kombination aus Irinotecan und Entinostat führt zu einer deutlichen Apoptose-Induktion in HCT116 p53wt Zellen

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 24, bzw. 48 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) (A und C) und der Zelltod (B und D) gemessen. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

Um zu zeigen dass die Kombination aus Entinostat und Irinotecan zu einer synergistischen Verstärkung der Einzelbehandlung führt, wurden Dosis-Wirkungskurven beider Substanzen erstellt (Anhang Abb. A.2), anhand deren Daten CI -Werte berechnet wurden (Anhang Tabelle A.1). Beide HCT116 p53wt und p53-/- Zelllinien zeigten eine verstärkende apoptotische Wirkung durch die Kombination aus Irinotecan und Entinostat. Mehrere Kombinationen aus CPT-11 und MS-275 zeigten in den HCT116 p53wt Zellen synergistische Effekte, darunter auch die in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 2 μ M MS-275 und 10 μ M CPT-11. Dass in den HCT116 p53-/- Zellen pseudo-synergistische Werte auftraten, lag am Algorithmus, der dem Programm CalcuSyn zugrunde liegt. Unter Berücksichtigung der Dosis-Wirkungskurven (Anhang Abb. A2) wurde ersichtlich, dass nur in den

HCT116 p53wt Zellen eine deutliche Verstärkung der Irinotecan-Wirkung durch Entinostat zu beobachten war.

5.1.2 Der mitochondriale Apoptose-Weg wurde in HCT116 p53wt Zellen durch Caspasen initiiert

Nachdem sich gezeigt hatte, dass p53 in HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat deutlich die mitochondriale Integrität beeinflusst, sollten weiter Experimente zeigen ob dabei der intrinsische Apoptose-Weg initiiert wurde. Dazu wurden beide HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zelllinien 24 h mit 10 µM CPT-11, 2 µM MS-275 und der Kombination aus beiden behandelt. Im Western Blot (Abb. 5.2 A) war zu sehen, dass CPT-11 alleine die Expression von p53 auf Proteinebene stark erhöhte.

Die Kombination mit MS-275 konnte die Gesamtmenge an p53 nicht steigern, jedoch den Anteil an acetyliertem p53 im Vergleich zur Einzelbehandlung mit CPT-11. Nach Behandlung mit MS-275 alleine und in der Kontrolle wurde kaum Acetylierung von p53 gemessen. Es wurden zwei Antikörper gegen acetyliertes Lysin 382 (acK382) und acetyliertes Lysin 373 (acK373) verwendet. Beide Lysin-Reste liegen im C-terminalen Ende, der sogenannten regulatorischen Domäne, von p53 (Krummel *et al.*, 2005). Der Anteil der Acetylierung beider Lysine im Verhältnis zum p53 Gesamtprotein wurde densitometrisch bestimmt (Abb. 5.2 B). Die Acetylierung der Lysine 373 und 382 nahm durch die Behandlung mit CPT-11 alleine bereits stark zu, wurde jedoch durch die Kombination mit MS-275 nochmals verstärkt. Dabei steht die Acetylierung des Lysins 373 in Zusammenhang mit gesteigerter Phosphorylierung des p53-N-Terminus und gesteigerter Apoptose (Zhang *et al.*, 2006; Knights *et al.*, 2006).

In einem weiteren Versuch wurden HCT116 Zellen mit geringen Mengen Ethidiumbromid (EtBr) behandelt um gezielt das mitochondriale Genom zu schädigen. Dabei sollten kaum Schäden am nuklearen Genom auftreten (Kao *et al.*, 2011; Binder *et al.*, 2005; King *et al.*, 1972; Wiseman und Attardi, 1978). Da CPT-11 sowohl das nukleare, als auch das mitochondriale Genom schädigt (Pommier, 2006; Diaz und Wellinger, 2009), sollte durch diesen Versuch geklärt werden, ob der mitochondriale Schaden alleine ausreichend ist, um p53 zu acetylieren und zu aktivieren. Durch Western Blot konnte allerdings gezeigt werden, dass dies nicht der Fall war (Anhang Abb. A.3). Die p53-Proteinmenge wurde weder durch 50 ng/ml EtBr

alleine, noch durch EtBr in Kombination mit 2 μ M MS-275 gesteigert und es konnte keine Acetylierung der Lysine 373 und 382 beobachtet werden.

Einhergehend mit der gesteigerten Acetylierung von p53, wurde nach kombinierter Behandlung von CPT-11 mit MS-275 auch deutlich mehr Spaltprodukt von *Poly-(ADP-ribose)-polymerase 1* (cl. PARP1) und Caspase 3 (cl. Caspase 3) im Western Blot detektiert. PARP Spaltung ist ein Indikator für DNA-Schäden und tritt auch nach vorangeschrittener Apoptose auf (Nagata, 2000). Die Spaltung der Caspase 3 zeigte außerdem, dass der mitochondriale Apoptose-Weg aktiv war. Dieser intrinsische mitochondriale Apoptose-Weg führt nach der Initiation über Effektor-Caspasen (3, 6 oder 7) zu DNA-Fragmentierung und zu weiterer PARP1-Spaltung (Kim *et al.*, 2005; Enari *et al.*, 1998). Beides belegte, dass in HCT116 p53wt Zellen bereits nach 24 h die mitochondriale Apoptose begann.

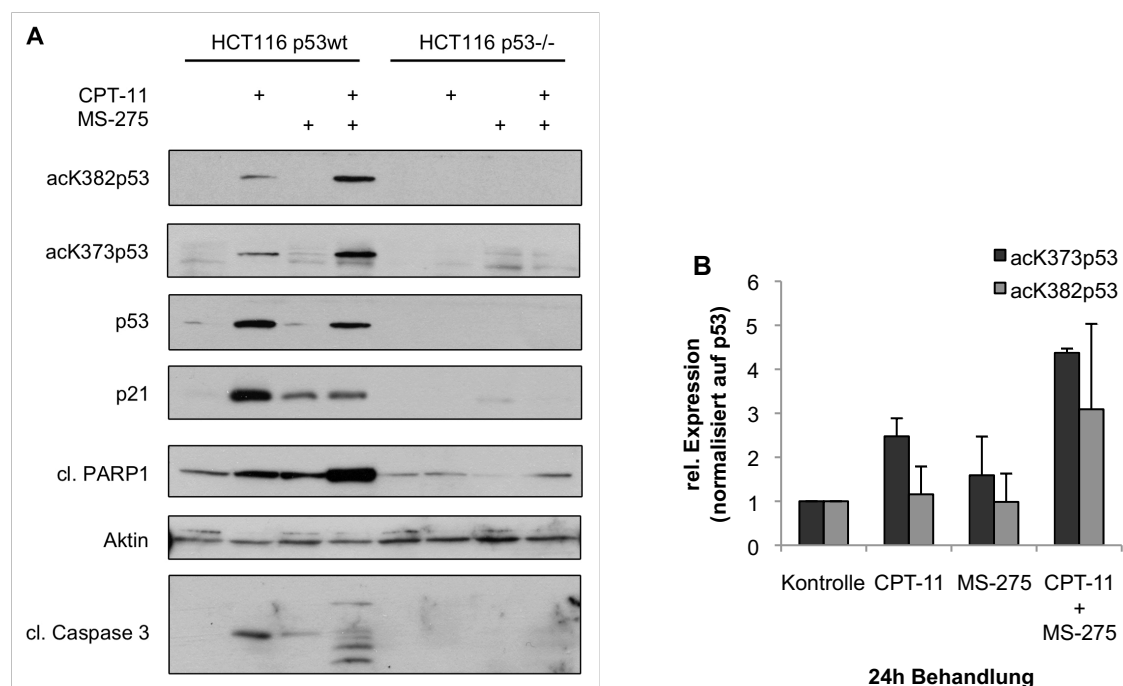


Abbildung 5.2: Auch auf Proteinebene zeigen HCT116 p53wt Zellen stärkere Anzeichen von Apoptose nach kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat

Durch Western Blot (A) wurde in HCT116 p53wt und p53-/- Zellen die Expression und post-translationale Modifikation von p53 nach 24 h Behandlung mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) untersucht. Parallel wurden die Mengen an p21 und den Spaltprodukten von PARP1 und Caspase 3 untersucht. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Anschließend wurden die Mengen an acK373 und acK382p53 in HCT116 p53wt Zellen (B) densitometrisch mit ImageJ 1.67 ausgewertet und auf die Expression von p53 normalisiert. Die Abb. B zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die p21-Proteinexpression in HCT116 p53wt Zellen wurde vor allem durch die CPT-11 Einzelbehandlung gesteigert (Abb. 5.2). Nach kombinierter Behandlung mit MS-275 war die p21-Menge deutlich geringer und in etwa auf dem Niveau der MS-275-

Einzelbehandlung. P21 ist Teil der DNA-Schadensantwort und initiiert Zellzyklus-Arrest und Reparaturprozesse. Außerdem wird die p21-Transkription von p53 reguliert (Bunz *et al.*, 1998; Mahyar-Roemer und Roemer 2001). Die geringere p21 Expression nach kombinierter Behandlung mit CPT-11 und MS-275 könnte in Zusammenhang mit der erhöhten Acetylierung von p53 stehen. Das würde bedeuten, dass stark acetyliertes p53 weniger DNA-Reparatur, dafür aber mehr Apoptose einleitet. HCT116 p53^{-/-} haben ebenfalls p21, allerdings sind die Proteinmengen im Vergleich zu den HCT116 p53^{wt} Zellen sehr gering und waren bei der dargestellten Exposition des Western Blots nicht detektierbar.

Ein weiteres Indiz für die Caspase-abhängige Apoptose-Induktion lieferten Experimente mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD-FMK (zVAD) (Abb. 5.3). Dabei konnte gezeigt werden, dass 20 μ M zVAD den Verlust von $\Delta\Psi_M$ und den Zelltod in kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat signifikant reduzierte (p -Werte $< 0,05$). zVAD hatte einen deutlich stärkeren Einfluss auf die HCT116 p53^{wt} Zellen, als auf HCT116 p53^{-/-} Zellen. Nach 48 h Behandlung konnte der Verlust von $\Delta\Psi_M$, bzw. der Zelltod in HCT116 p53^{wt} nach CPT-11 und MS-275 Behandlung in Kombination mit zVAD von 80%, bzw. 40% auf 12%, bzw. 16% gesenkt werden (Abb. 5.3). Der intrinsische Apoptose-Weg war unter diesen Bedingungen p53-abhängig. Ein anderer Mechanismus musste für den induzierten Zelltod und den Verlust des $\Delta\Psi_M$ in den HCT116 p53^{-/-} Zellen verantwortlich gewesen sein. Dass zVAD auch den Verlust von $\Delta\Psi_M$ reduzierte wurde bereits zuvor beobachtet (Feldmann *et al.*, 2000; Mediavilla-Varela *et al.*, 2009; Li *et al.*, 1999) und hing wahrscheinlich damit zusammen, dass die basale Aktivität der Caspasen durch die Vorbehandlung mit zVAD gehemmt wurde und es nicht zu Caspase-abhängiger Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*; MOMP). Von Colell *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von Caspasen Zellen vor der Permeabilisierung ihrer Membranen und damit vor dem Verlust von $\Delta\Psi_M$ bewahrt.

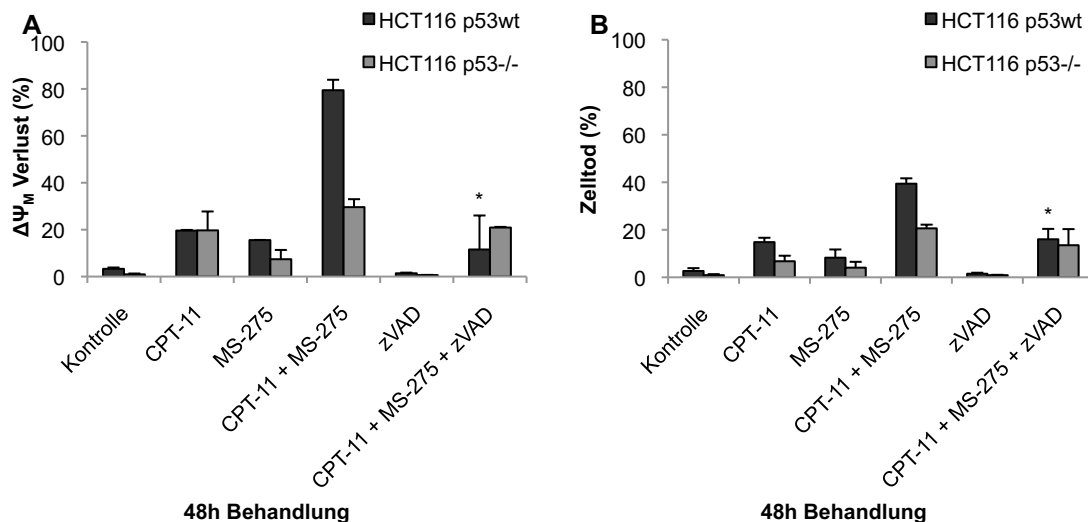


Abbildung 5.3: z-VAD-FMK in Kombination mit Irinotecan und Entinostat schützt vor dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 48 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 20 μ M z-VAD-FMK (zVAD) alleine und in Kombination mit CPT-11 und MS-275 behandelt. zVAD wurde jeweils 1 h vor Zugabe der anderen Substanzen zugegeben. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) (A) und der Zelltod (B) gemessen. Die Abbildungen A und B zeigen jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die Behandlung mit CPT-11 und MS-275 bezogen.

5.1.3 Durch Entinostat sank die Transkription von p53-Zielgenen

P53 reguliert die Transkription mehrerer Gene und kann darüber sowohl Zellreparaturprozesse, als auch die Apoptose starten. Stressreize aktivieren p53. Bei kurzzeitigem, niedrigem Stresspegel leitet p53 die Reparatur der Zelle ein. Dauert ein Stressreiz länger an oder schädigt eine Zelle irreversibel, so aktiviert p53 Prozesse die zum Tod der Zelle führen (Chen *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2009; Gottlieb und Vousden, 2010). Einige Proteine, deren Gene von p53 reguliert werden, sind p21 (*CDKN1A*), PUMA (*BBC3*), MDM2 (*MDM2*) und BAX (*BAX*) (Jeffers *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004; Bunz *et al.*, 1998; Kubbutat *et al.*, 1997). In diesem Abschnitt wurde die mRNA-Expression dieser vier Proteine nach 12 und 24 h Behandlung mit 10 μ M Irinotecan und 2 μ M Entinostat untersucht (Abb. 5.4). Überraschenderweise ergab sich für alle vier untersuchten Proteine die gleiche Situation, nämlich dass die Einzelbehandlung mit CPT-11 p53-Zielgene in den HCT116 p53wt Zellen aktivierte, dies jedoch deutlich durch die Kombination mit MS-275 reduziert wurde. Dies war konsistent für 12 und 24 h Behandlungszeit. Im Fall von p21 wurde im Abschnitt zuvor die Proteinexpression durch Western Blot untersucht (Abb. 5.2). Dabei zeigte sich bereits, dass die p21-Proteinmenge in HCT116 p53wt Zellen nach kombinierter

Behandlung aus MS-275 und CPT-11 geringer war, als nach der Behandlung mit CPT-11 alleine. Diese Beobachtung wiederholte sich für die *CDKN1A* mRNA-Expression (Abb. 5.4 C) und lieferte damit einen möglichen Grund für die geringere p21-Proteinmenge. Die Proteinexpression von BAX und PUMA wurde in einem späteren Abschnitt betrachtet (Anhang Abb. A.5). Beide Proteine spielen für die p53-abhängige Apoptose eine bedeutende Rolle (Jeffers *et al.*, 2003; Villunger *et al.*, 2003).

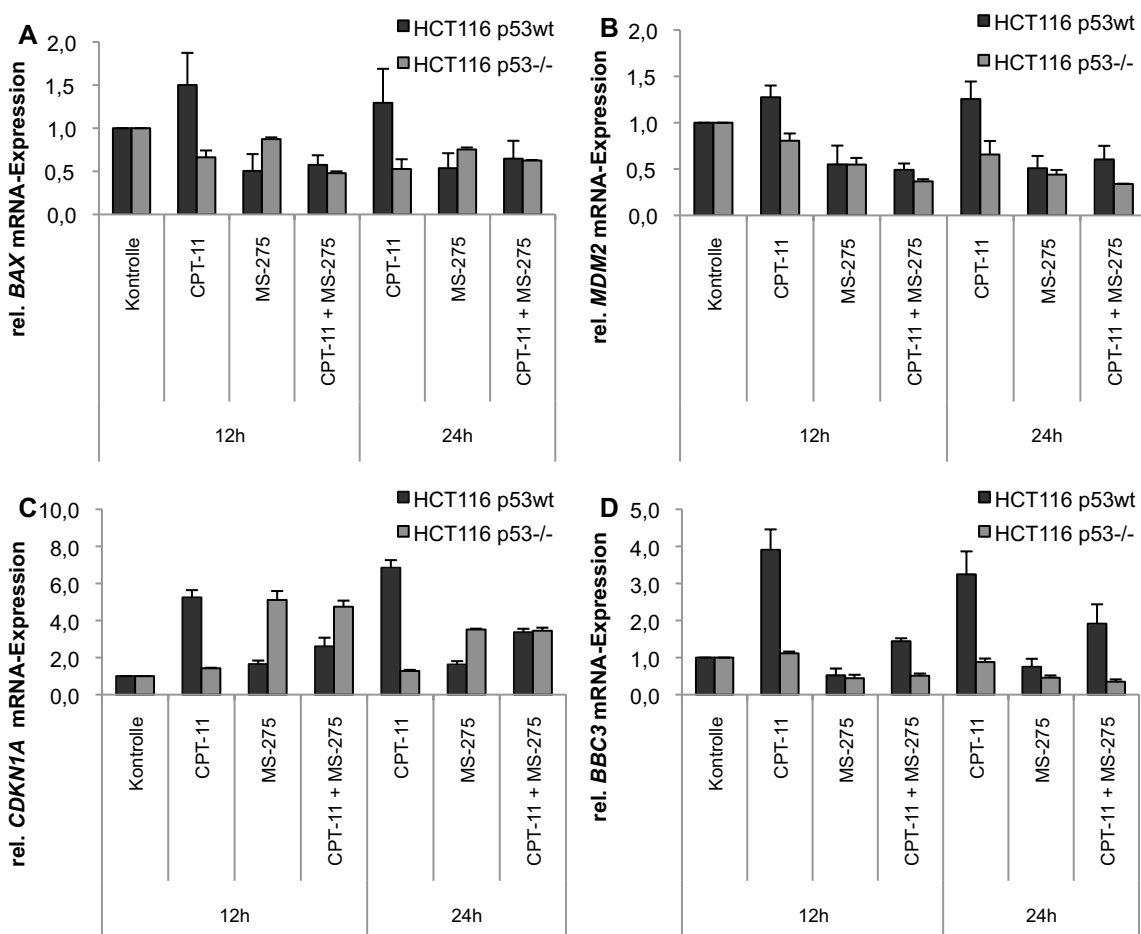


Abbildung 5.4: Die relative mRNA-Expression von p53-regulierten Genen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat zeigt Unterschiede zwischen den HCT116 Zelllinien

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 12, bzw. 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Durch qRT-PCR wurde die relative mRNA-Expression der Proteine BAX (BAX) (A), MDM2 (MDM2) (B), p21 (CDKN1A) (C) und PUMA (BBC3) (D) im Vergleich zu β -2-Microglobulin gemessen und die Werte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet. Anschließend wurden die Werte auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Jürgen Sonnemann durchgeführt.

Der Einsatz von Entinostat schien die transkriptionelle Aktivität von p53 deutlich zu senken, wohingegen die Apoptose-Induktion dadurch verstärkt wurde (Abschnitt 5.2). Höhere mRNA-Mengen der pro-apoptotischen Proteine BAX und PUMA nach CPT-11-Einzelbehandlung schienen dabei aber nicht hauptverantwortlich für die

mitochondriale Apoptose zu sein, denn diese trat deutlich stärker nach kombinierter Behandlung mit MS-275 auf, bei gleichzeitig geringeren mRNA-Mengen.

In den HCT116 p53^{-/-} Zellen wurden unterschiedliche mRNA-Expressionen gemessen, als in den HCT116 p53^{wt} Zellen (Abb. 5.4). In HCT116 p53^{-/-} Zellen sanken die mRNA-Mengen der pro-apoptotischen Proteine BAX und PUMA nach Behandlung, dafür aber stiegen die des Zellzyklusregulators p21. Die mRNA-Expression von *MDM2*, *BAX* und *BBC3* sank nach Behandlung mit CPT-11 und MS-275 alleine, aber auch in der Kombination beider Substanzen. Bei *CDKN1A* hingegen wurde die Expression der mRNA durch die Behandlung von MS-275 alleine und auch in der Kombination mit CPT-11 induziert (Abb. 5.4 C). Trotz der Regulation von p21 durch p53 kann die p21-Proteinexpression alleine durch DNA-Schäden und CHK2-Aktivierung gesteigert werden (Macleod *et al.*, 1995; Aliouat-Denis *et al.*, 2005).

5.1.4 Acetyliertes p53 lokalisierte an den Mitochondrien nach genotoxischem Stress

Seit längerem ist bekannt, dass ein Teil des zytosolischen p53 auch an und in Mitochondrien lokalisiert ist (Mihara *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2011; Vaseva und Moll, 2013). Dies ist häufig die Folge von andauerndem Stress. In den bisher dargestellten Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktiviertes p53 die mitochondriale Integrität beeinflusste und dass die Acetylierung von p53 den intrinsischen Apoptose-Weg induzierte. Es sollte nun geklärt werden, in welcher Menge p53 an Mitochondrien im Vergleich zum Zytosol lokalisiert war. Durch sub-zelluläre Fraktionierungen wurde die Lokalisierung von p53 genauer untersucht. Dabei wurden HCT116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen in eine mitochondriale und eine zytosolische Fraktion aufgeteilt (Abb. 5.5 A). Der Kern und die Zellmembranen wurden in diesen Versuchen nicht betrachtet. Nach 24 h Behandlung mit Irinotecan war in HCT116 p53^{wt} Zellen ein großer Teil des zytosolischen p53 an den Mitochondrien lokalisiert. Durch die Kombination mit 2 μ M Entinostat wurde die Acetylierung von p53 am Lysin 382 in beiden Fraktionen weiter gesteigert, die Gesamtproteinmenge im Vergleich zur CPT-11-Einzelbehandlung jedoch nicht. In einem weiteren Experiment wurden HCT116 p53^{wt} Zellen 24 h mit CPT-11 kombiniert mit MS-275 behandelt und in Zytosol und Mitochondrien fraktioniert. Durch weitere Behandlung mitochondrialer Fraktionen mit Natriumcarbonat konnten

diese in ihre löslichen Matrixproteine und die unlöslichen Membranen getrennt werden (Fujiki *et al.*, 1982 a und b; Brooks *et al.*, 2011) (Abb. 5.5 B). Lösliche Proteine, die im Intermembranraum (IMS, *inter membrane space*) der beiden mitochondrialen Membranen lokalisiert waren, waren auch in der Membranfraktion zu finden. Dazu zählte beispielsweise Cytochrom *c* (Budihardjo *et al.*, 1999). Gesamtzelllysate wurden zum Vergleich ebenfalls untersucht. P53 war in allen Fraktionen vertreten, wobei die kombinierte Behandlung aus CPT-11 und MS-275 zu einer Erhöhung der Proteinmenge in der jeweiligen Fraktion führte. Bei der Betrachtung der mitochondrialen Fraktionierung fiel auf, dass p53 vor Allem an der Membran und weniger in der Matrix vorlag (Abb. 5.5 B). Die Acetylierung von p53 konnte nach Behandlung ebenfalls in allen Fraktionen nachgewiesen werden und die Menge an acetyliertem p53 stand in etwa in Relation zur Gesamtproteinmenge. Die Lokalisation an den Membranen könnte für eine Interaktion mit pro-apoptotischen Proteinen sprechen.

Diese beiden Versuche (Abb. 5.5) zeigten, dass p53 zwar bereits in unbehandelten Zellen an Mitochondrien lokalisiert war, dass aber die C-terminal acetylierte Variante erst nach Behandlung mit CPT-11 dort zu finden war und dass diese durch die Behandlung mit MS-275 noch gesteigert werden konnte. Bisher wurde nicht beschrieben, dass der C-Terminus alleine eine Rolle für den intrinsischen Apoptose-Weg spielt (Feng *et al.*, 2005; Krummel *et al.*, 2005). Vielmehr wird davon ausgegangen, dass die Acetylierung im Bereich der DNA-Bindungsdomäne (DBD) von p53 für die mitochondriale Apoptose-Induktion mit verantwortlich ist (Mihara *et al.*, 2003; Sykes *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Zusammen mit den vorangegangenen Experimenten (Abb. 5.1), deuteten die hier gezeigten Daten darauf hin, dass auch der C-Terminus von p53 eine Rolle an Mitochondrien spielen könnte.

Die Untersuchung von Cytochrom *c* (Cyt *c*) zeigte, dass das Protein noch an der Membranfraktion gebunden war und dass nach Behandlung mit CPT-11 und MS-275 weniger Cyt *c* in den Mitochondrien vorlag, als in der Kontrolle (Abb. 5.5 B). Dafür wurde das Protein nach Behandlung im Zytosol detektiert. Eine Freisetzung von Cyt *c* aus den Mitochondrien ist ein Zeichen für die Permeabilisierung der äußeren Membran. MOMP tritt nach Stress auf und initiiert den Caspase-abhängigen intrinsischen Apoptose-Weg (Kroemer *et al.*, 2007).

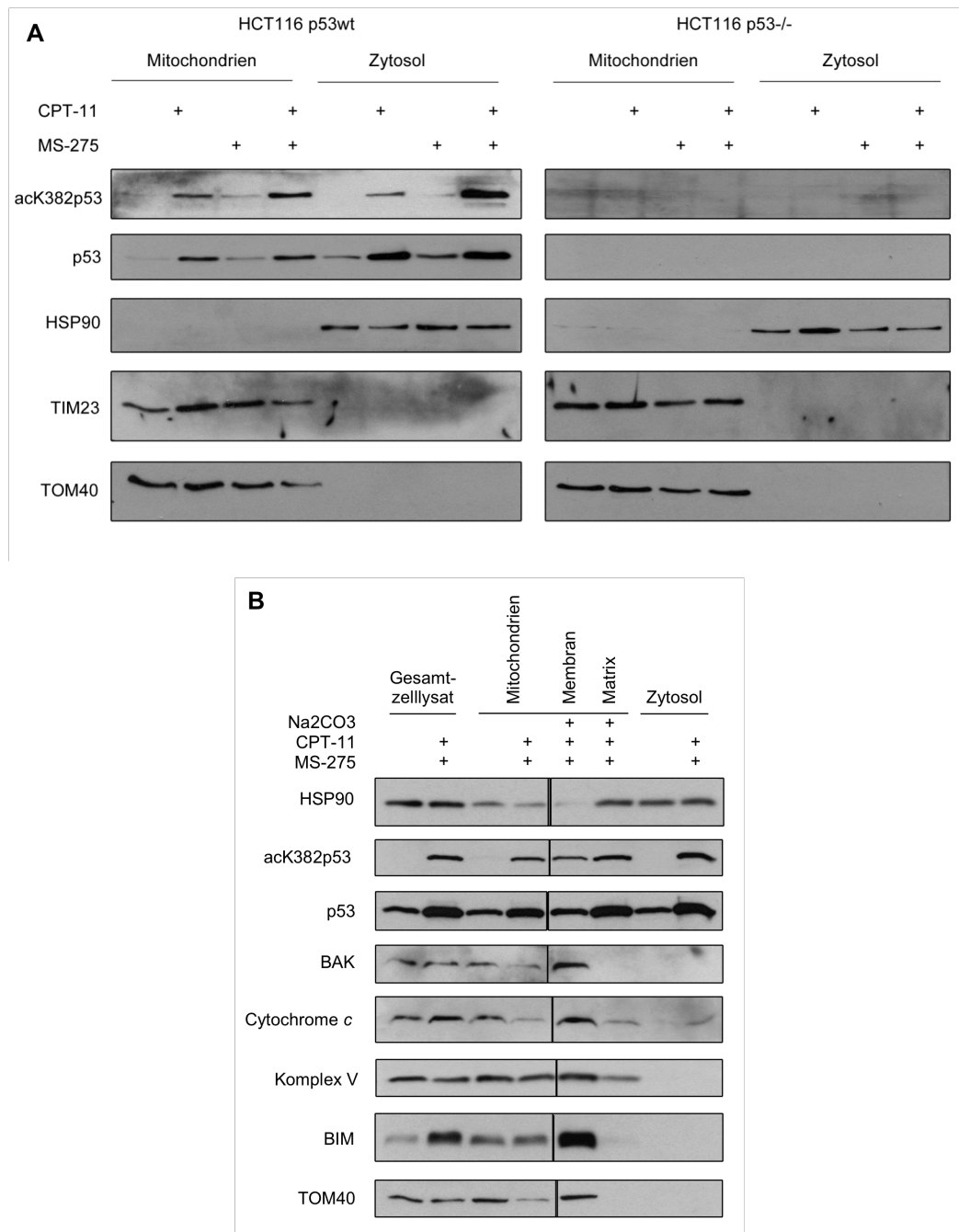


Abbildung 5.5: Sub-zelluläre Fraktionierungen zeigen, dass p53 nach kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat sowohl an der mitochondrialen Membran, als auch in der mitochondrialen Matrix zu finden ist

HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen wurden 24 h mit 10 µM Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 µM Entinostat (MS-275) behandelt. Nach Fraktionierung der Zelllysate in Mitochondrien und Zytosol wurde mittels Western Blot die Lokalisation und post-translationale Modifikation von p53 nachgewiesen (A). HSP90 diente als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion und TOM40, bzw. TIM23 wurden als Ladekontrollen für die mitochondriale Fraktion verwendet. Durch Natriumcarbonat (Na₂CO₃)-Behandlung wurden isolierte Mitochondrien aus HCT116 p53wt Zellen weiter in lösliche Matrix- und Membranbestandteile aufgetrennt (B). Mittels Western Blot wurde die Expression und Lokalisation von p53, BAK, BIM und Cytochrom c untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion und TOM40 und Komplex V wurden als Ladekontrollen für die mitochondriale Membranfraktion verwendet.

Anzeichen für die Induktion dieses Apoptose-Weges wurden in dieser Arbeit bereits zuvor gefunden (Abb. 5.2) und stehen auch in Zusammenhang mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 5.1).

Die Lokalisierung der beiden pro-apoptotischen Proteine BAK und BIM wurde ebenfalls betrachtet. P53 interagiert sowohl mit BAX als auch mit BAK an der mitochondrialen Membran und verursacht dort eine Oligomerisierung beider Proteine (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004) und führt damit zu MOMP. In diesem Versuch konnte keine Steigerung der BAK Proteinmenge nach p53 Aktivierung gemessen werden. Das Protein war nur in der mitochondrialen Membranfraktion zu finden und nicht in der Matrix oder im Zytosol (Abb. 5.5 B). Allerdings widersprach dies nicht einer Interaktion von p53 mit BAK, da die Oligomerisierung von BAK durch Western Blot nicht abgebildet werden konnte. BIM wird weder transkriptionell von p53 reguliert, noch ist eine Interaktion beider Proteine beschrieben. Vielmehr hat BIM p53 ähnliche Funktionen an Mitochondrien. Es kann anti-apoptotische Proteine blockieren und somit pro-apoptotische Proteine aktivieren und MOMP induzieren (Cheng *et al.*, 2003; Hemann und Lowe, 2006; Akiyama *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010). Eine Beteiligung von p53 würde allerdings die Permeabilisierung deutlich verstärken. In den HCT116 p53wt Zellen wurde eine Aktivierung von BIM durch die Behandlung mit CPT-11 und MS-275 gefunden. Das Protein war, wie BAK, nur in der mitochondrialen Membranfraktion detektierbar.

Darüber hinaus wurde in anderen Experimenten gezeigt (Anhang Abb. A.4), dass BIM nach Behandlung mit CPT-11, MS-275 und der Kombination aus beiden deutlich stärker in HCT116 p53^{-/-} Zellen aktiviert wurde, als in HCT116 p53wt Zellen. BIM könnte die fehlende Funktion von p53 kompensieren und nach genotoxischem Stress die mitochondriale Apoptose auch in p53-negativen Zellen auslösen. BIM kann unter Anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) aktiviert werden (Hagenbuchner *et al.*, 2012), die häufig nach DNA-Schäden in Zellen akkumulieren.

5.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies akkumulierten in HCT116 Zellen als Folge von genotoxischem Stress

Um eine mögliche Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Induktion von BIM und dem mitochondrialen Apoptose-Weg zu untersuchen, wurden die zytosolischen ROS Mengen gemessen. Beide HCT116 Zelllinien wurden für 24 h mit

10 μ M CPT-11 und 2 μ M MS-275 jeweils alleine oder in Kombination behandelt (Abb. 5.6). In beiden Zelllinien kam es zu einem starken Anstieg an zytosolischen ROS, wobei die HCT116 p53^{-/-} Zellen wesentlich mehr ROS hatten als die HCT116 p53^{wt} Zellen. Eine gesteigerte BIM-Proteinexpression in den p53-negativen Zellen durch deutlich mehr zytosolische ROS lag daher nahe. Die HCT116 p53^{wt} Zellen hatten sowohl nach Behandlung mit Irinotecan alleine, als auch in Kombination mit Entinostat eine Zunahme an ROS um das 3,4-, bzw. 3,7-fache (p -Wert im Vergleich zur Kontrolle $< 0,01$ CPT-11; $< 0,05$ CPT-11 + MS-275). HCT116 p53^{-/-} Zellen zeigten sogar eine Zunahme um das 6,8- (CPT-11 alleine; p -Wert im Vergleich zur Kontrolle $< 0,001$), bzw. 6,0-fache (Kombination mit MS-275; p -Wert im Vergleich zur Kontrolle $< 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Zunahme der ROS nach genotoxischem Stress war damit in den p53-negativen Zellen fast doppelt so hoch wie im Wildtyp.

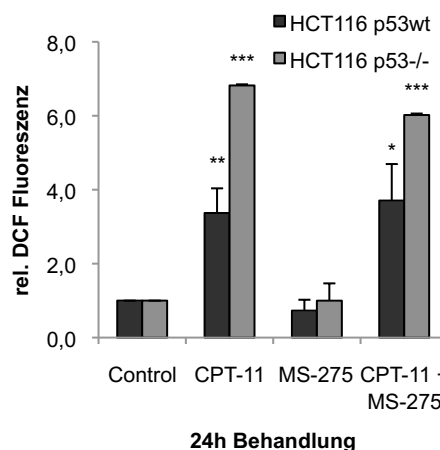


Abbildung 5.6: Gesteigerte Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies treten nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat in HCT116 Zellen auf

HCT116 p53^{wt} und p53^{-/-} Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die DCF Fluoreszenz, als Maß für intrazelluläre ROS gemessen. Die Abbildungen A und B zeigen jeweils die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Die dargestellten relativen Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Signifikanzen wurden mittels T -Test berechnet (p -Wert: * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$) und sind auf die Kontrolle bezogen.

Eine mögliche Erklärung dafür war, dass p53 den Redox-Status der Zelle reguliert und damit ROS aktiv reduzieren kann (Gottlieb und Vousden, 2010; Maddocks und Vousden, 2011). Interessanterweise fiel auf, dass die Behandlung mit dem HDACi alleine keine ROS Akkumulation zur Folge hatte, obwohl für MS-275 beschrieben ist, dass es reaktive Sauerstoffspezies in Tumorzellen induziert (Rosato *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2004). In den hier dargestellten Versuchen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 5.6). Hinzu kam, dass die Kombination aus CPT-11 und MS-275 die Menge an ROS, im Vergleich zur CPT-11-Einzelbehandlung nicht steigerte.

Die Akkumulation der ROS schien alleine vom DNA-Schaden nach Irinotecan-Behandlung und dem zellulären p53-Status abhängig zu sein. Mehr reaktive Sauerstoffspezies stehen häufig auch mit Änderungen des Metabolismus und vor Allem der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zusammen. Dieser Aspekt wurde zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit betrachtet (Abschnitt 5.2).

5.1.6 Durch Elektronenmikroskopie wurden mitochondriale Schäden und morphologische Änderungen sichtbar

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Behandlung mit 10 μ M Irinotecan und 2 μ M Entinostat p53-abhängige, starke mitochondriale Schäden verursacht hatte, sollte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen die mitochondriale Morphologie untersucht werden. HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden nach 24 h Behandlung mit CPT-11 und MS-275 durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert (Abb. 5.7, obere Reihen). In unbehandelten HCT116 p53wt Zellen (Abb. 5.7 A) lagen die Mitochondrien als längliche Strukturen mit intakten *Cristae* vor. Nach Behandlung mit CPT-11 alleine waren die Mitochondrien kleiner, kugelartig und hatten zum Teil defekte, bzw. fehlende *Cristae*. Es wurden auch erste Anzeichen mitochondrialer Autophagie, sogenannte Mitophagie (Scheibye-Knudsen *et al.*, 2012; Teckman *et al.* 2004) entdeckt (Abb. 5.7 dunkle, geschädigte Mitochondrien). Die Behandlung mit MS-275 alleine hatte in den HCT116 p53wt Zellen ebenfalls die Folge, dass die Mitochondrien kleiner und sphärisch waren. Allerdings zeigte sich kein Abbau dieser Organellen. Nach Kombination von CPT-11 und MS-275 wurden die Schäden der Mitochondrien sehr deutlich (Abb. 5.7). Viele Zellen enthielten nun kleine, kugelartige Mitochondrien mit defekten oder fehlenden *Cristae*. Der Abbau der Mitochondrien war stark vorangeschritten und es zeigten sich deutliche Zeichen von Mitophagie (Abb. 5.7 dunkle, geschädigte Mitochondrien mit teilweise vesikulären Strukturen um sie herum). In den HCT116 p53-/- Zellen lagen die Mitochondrien in der Kontrolle, ähnlich zum Wildtyp, länglich und mit intakten *Cristae* vor (Abb. 5.7 B). Allerdings waren diese Mitochondrien insgesamt etwas kugelartiger als in den HCT116 p53wt. Nach kombinierter Behandlung mit CPT-11 und MS-275 wurde in den p53-negativen Zellen auch mitochondrialer Abbau sichtbar, allerdings in einem deutlich geringeren Maße.

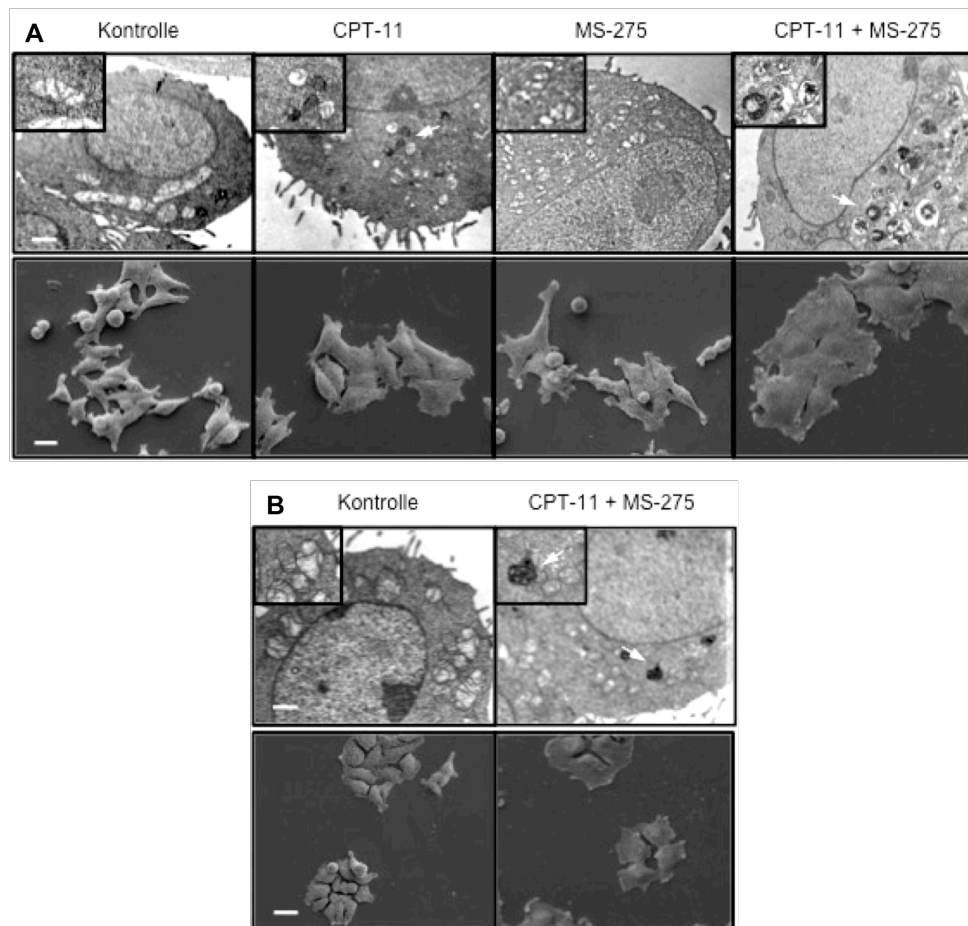


Abbildung 5.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat deuten auf mitochondriale Schäden hin

HCT116 p53wt (A) und p53-/- (B) Zellen wurden 24h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Die Proben wurden anschließend fixiert und entweder für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (obere Reihen) oder die Rasterelektronenmikroskopie (REM) (untere Reihen) verwendet. Bei den TEM-Aufnahmen wurden mitochondriale Strukturen zusätzlich vergrößert dargestellt. Die Skala entspricht bei den TEM-Aufnahmen 1 μ m und bei den REM-Aufnahmen 20 μ m. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für das gesamte Experiment und wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von PD Dr. Martin Westermann angefertigt.

Um die Frage zu klären, ob tatsächlich Autophagie dafür verantwortlich sein könnte, dass die Mitochondrien in den HCT116 Zellen nach genotoxischem Stress abgebaut wurden, wurde die Autophagie mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 5.8). Nach 24 h Behandlung trat in beiden HCT116 Zelllinien gesteigerte Autophagie durch die CPT-11-Behandlung auf. Entinostat hatte zu diesem Zeitpunkt noch keinen Einfluss darauf (Abb. 5.8 A). Allerdings waren die Autophagie-Werte in den HCT116 p53wt etwas höher. Nach 48h Behandlung zeigte sich ein deutlich verändertes Bild (Abb. 5.8 B). Beide Zelllinien hatten zwar weiter gesteigerte Autophagie durch CPT-11 Behandlung, aber die HCT116 p53wt Zellen hatten 8-fach mehr Autophagie (p -Wert $< 0,001$) als in der Kontrolle und 2,5-fach mehr als die p53-negativen Zellen (p -Wert zwischen HCT116 p53wt und p53-/- $< 0,01$). Die p53-abhängige Regulation der

Autophagie könnte dafür eine Erklärung sein (Goehe *et al.*, 2012; Gewirtz, 2013). Die Behandlung mit MS-275 hatte alleine kaum einen Einfluss auf die Autophagie in den HCT116 p53wt Zellen. Jedoch führte die Kombination aus MS-275 und CPT-11 zu einer deutlichen Verringerung der Autophagie im Vergleich zur CPT-11 Einzelbehandlung (Abb. 5.8 B). Die Autophagie war nur noch 1,8-mal so hoch wie in der Kontrolle. Die verstärkte Acetylierung von p53 könnte dazu zu geführt haben, dass die Autophagie weniger stark aktiviert werden konnte. Die HCT116 p53^{-/-} Zellen hatten nach Behandlung mit CPT-11 3-fach mehr Autophagie als die Kontrolle. Die Behandlung mit MS-275 alleine und in Kombination mit CPT-11 erhöhte diese Werte jeweils auf das 4-fache des Kontrollwertes. Damit zeigte sich, dass die p53-negativen Zellen vollkommen verschieden auf die Behandlungen reagierten im Vergleich zum Wildtyp.

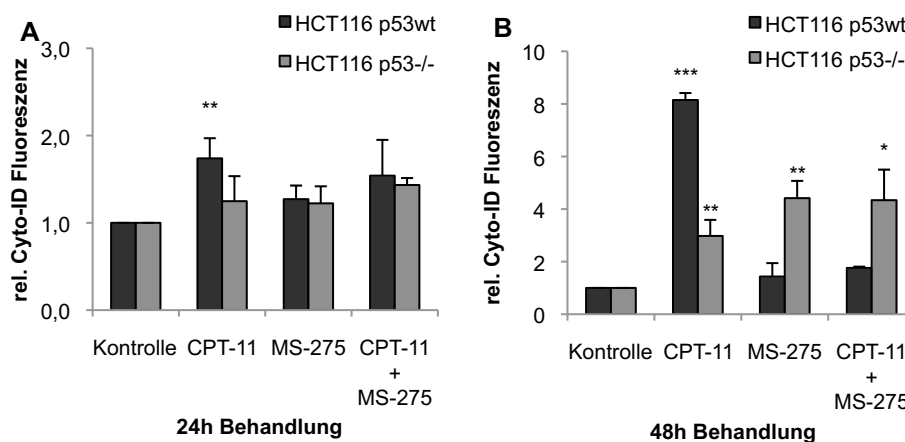


Abbildung 5.8: Erhöht Autophagie tritt in HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan auf
HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen wurden 24, bzw. 48h mit 10 µM Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 µM Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde Autophagie anhand der Cyto-ID Fluoreszenz gemessen. Die Abbildungen A und B zeigen jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Alle Daten wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die Kontrolle bezogen.

Zusätzlich wurde durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) die Morphologie der gesamten Zellen nach Behandlung untersucht (Abb. 5.7 untere Reihen). In beiden HCT116 Zelllinien änderte sich die Morphologie nach Behandlung mit CPT-11. Die Zellen wurden flach, strukturlos und vergrößerten ihren Durchmesser, wobei der HDACi und der zelluläre p53-Status darauf nur wenig Einfluss hatten. Diese Änderungen sind häufig ein Zeichen von Seneszenz und können rein durch DNA-Schäden nach Chemotherapie induziert werden und können Veränderungen des

zellulären Metabolismus zur Folge haben (Kuilman *et al.*, 2010). Dieser Punkt wird im Abschnitt 5.2 dieser Arbeit noch näher betrachtet werden.

Diese Versuche unterstützten die Beobachtungen, dass Irinotecan alleine bereits nach 24 h mitochondriale Schäden in HCT116 p53wt Zellen erzeugte und dass diese Schäden durch die Kombination mit Entinostat verstärkt wurden (Abb. 5.2). Hier wurden die Schäden direkt sichtbar und nicht nur die Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Weges (Abb. 5.7). Die gesteigerte Autophagie (Abb. 5.8) diente möglicherweise dazu defekte Mitochondrien zu entfernen und könnte dazu geführt haben, dass das mitochondriale Membranpotential der HCT116 Zellen nach 24 h Behandlung mit CPT-11 wenig beeinflusst war (Abb. 5.1).

5.1.7 P53 wurde stark C-terminal acetyliert nach der kombinierten Behandlung aus Irinotecan und Entinostat

Nachdem die bisherigen Versuche darauf hin deuteten, dass die post-translationale Modifikation von p53 eine entscheidende Rolle für die Induktion der mitochondrialen Apoptose hatten, sollte diese Hypothese durch weitere Versuche genauer untersucht werden. Die Beobachtung, dass der HDACi MS-275 den toxischen Effekt des Topoisomerase-I-Inhibitors CPT-11 in HCT116 p53wt Zellen signifikant verstärkt hatte, legte nahe, dass eine gesteigerte p53 Acetylierung dafür verantwortlich sein könnte. Der C-Terminus von p53 und dessen post-translationale Modifikation schien darin involviert zu sein und eine bisher noch nicht beschriebene Funktion zu haben.

Mehrere C-terminale Lysine in p53 wurden durch die Kombination aus Irinotecan und Entinostat stärker acetyliert als durch die Einzelbehandlungen

In den Abschnitten 5.1.2 und 5.1.4 wurde gezeigt, dass die Behandlung mit 10 μ M CPT-11 bereits nach 4 h zu einer erhöhten post-translationalen Modifikation von p53 führte. Die Kombination mit 2 μ M MS-275 konnte vor Allem die Acetylierung im C-terminalen Bereich an den Lysinen 382 und 373 verstärken und, in Anbetracht der weiteren Versuche, auch die Aktivität von p53 und den toxischen Effekt von CPT-11 verstärken. In diesem Abschnitt wurden weitere Aminosäure-Reste in p53 auf deren post-translationale Modifikation durch Western Blot untersucht (Abb. 5.9). Einige der Modifikationen wurden anschließend durch die Software des LiCor Odyssey direkt ausgewertet. Der Anteil der jeweiligen Modifikation wurde danach in Relation zur p53-Gesamtmenge dargestellt (Abb. 5.9 B-D). Die Acetylierung des C-terminalen

Lysins 381 wurde durch die 12-, bzw. 24-stündige Behandlung mit Irinotecan gesteigert und konnte durch die Kombination mit MS-275 noch verstärkt werden (Abb. 5.9 C und D).

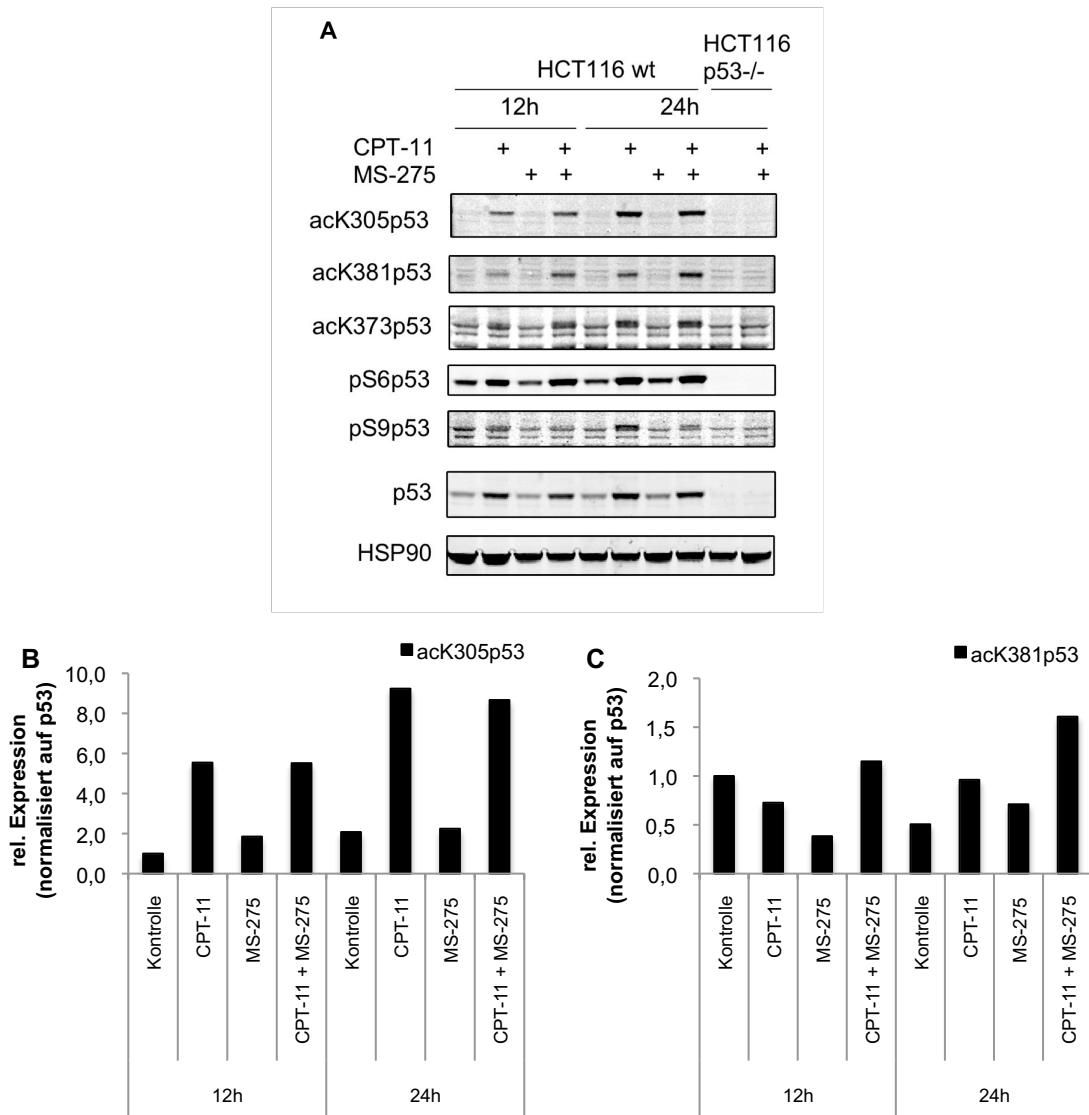


Abbildung 5.9: P53 wird an mehreren Positionen stark post-translational modifiziert nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat

HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen wurden 12, bzw. 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Western Blot wurden die Expression und die post-translational Modifikation von p53 an verschiedenen Positionen (A) untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle. Die Bandenintensitäten der post-translationalen Modifikationen wurden mit der LiCor Odyssey Software gemessen und anschließend auf die jeweilige p53 Gesamtmenge normalisiert. In den Abb. B-C sind die Intensitäten einiger Positionen dargestellt. Die zugrundeliegenden Experimente wurden am *Beatson Institute for Cancer Research* in Glasgow, UK im Rahmen eines externen Laborpraktikums und einer laufenden Kooperation durchgeführt.

Im Bereich des Lysins 373 wurde ebenfalls ein Signal detektiert, das allerdings wegen des starken Hintergrundsignals nicht vermessen werden konnte. Eine Verstärkung der Acetylierung an dieser Stelle durch CPT-11 in Kombination mit MS-275 hatte sich jedoch bereits vorher schon gezeigt (Abb. 5.2). Neben drei C-

terminalen Lysinen, wurde auch die Modifikation eines Lysin-Restes (K305) im Bereich der Tetramerisierungsdomäne untersucht (Abb. 5.9 A). Dieses Lysin 305 wurde im Vergleich zur Kontrolle, stark durch die CPT-11-Behandlung acetyliert (Abb. 5.9 B). Die Kombination mit dem HDACi hatte jedoch keine Auswirkung auf den Grad der Acetylierung. Zusätzlich zur Acetylierung wurde noch die Phosphorylierung zweier Serine (S6 und S9) im Bereich des N-Terminus von p53 untersucht. Dabei war deren Modifikation alleine von CPT-11 und dem resultierenden DNA-Schaden abhängig. Die Kombination mit MS-275 hatte keinen verstärkenden Effekt.

Dazu passend wurde von Saito *et al.* (2002) beschrieben, dass die Serine 6 und 9 durch ATM phosphoryliert werden. In einem Review von Bode und Dong (2004) wird beschrieben, dass die beiden Serine 6 und 9 außerdem von der Casein Kinase 1 phosphoryliert werden. Diese wird von Topoisomerase-Inhibitoren und den daraus resultierenden DNA-Schaden aktiviert. Beide Befunde unterstützten die Beobachtung, dass die Phosphorylierung der Serine 6 und 9 alleine vom DNA-Schaden abhing. HCT116 p53-/- Zellen wurden in diesem Versuch als Kontrolle der Antikörper-Spezifität untersucht.

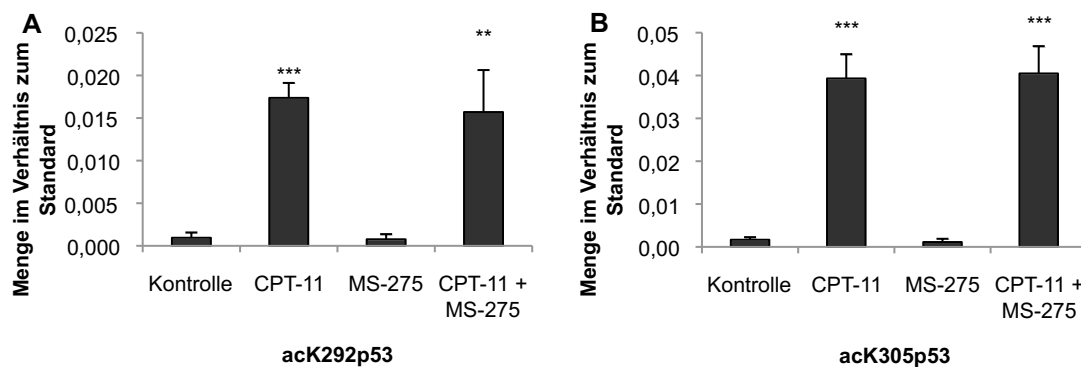
Zusammenfassend waren nach der kombinierten Behandlung mit CPT-11 und MS-275 deutliche Effekte auf die Acetylierung von p53 detektierbar. Dabei stellte sich heraus, dass vor Allem C-terminale Lysine auf die kombinierte Behandlung reagierten. Post-translationale Modifikationen in anderen Bereichen des Proteins wurden zwar durch Irinotecan erzeugt, jedoch nicht durch Entinostat verstärkt.

Durch Massenspektroskopie wurde die verstärkte C-terminale Acetylierung von p53 nach kombinierter Behandlung aus Irinotecan und Entinostat bestätigt

Eine sehr präzise Methode um post-translationale Modifikationen in Proteinen zu finden und diese zu quantifizieren ist die Massenspektroskopie. Mithilfe dieser Methode sollten in einem weiteren Experiment der Befund, dass die Kombination von 10 µM CPT-11 und 2 µM MS-275 die C-terminale Acetylierung von p53 im Vergleich zu CPT-11 alleine verstärkt, überprüft und der Acetylierungs-Grad von p53 bestimmt werden. In der Analyse wurden hauptsächlich Acetylierungsstellen im Bereich der Tetramerisierungsdomäne und des C-Terminus gefunden (Abb. 5.10). Mehrere Proteinfragmente wurden auf deren post-translationale Modifikationen untersucht und waren teilweise mehrfach modifiziert. So war das Fragment in der Abbildung

5.10 C an den Lysinen 319 und 320 acetyliert. Das dazugehörige Balkendiagramm gibt die Häufigkeit der Modifikation dieses Fragmentes im Vergleich zum p53-Gesamtprotein an und damit den Anteil dieser Modifikation in p53 nach der jeweiligen Behandlung. Gleiches gilt für alle anderen Diagramme der Abbildung 5.10. Im Bereich der Tetramerisierungsdomäne wurde anhand verschiedener Proteinfragmente die Acetylierung der Lysine 305, 319, 320 und 321 sowie die Phosphorylierung des Serins 315 nach 24 h Behandlung mit Irinotecan detektiert. Zusätzlich wurde die Acetylierung des Lysin 292 im Bereich der DNA-Bindungsdomäne nach Behandlung mit CPT-11 alleine und in Kombination mit MS-275 detektiert. Die Anteile der genannten Modifikationen waren im Vergleich zur Gesamtproteinmenge gering. Außerdem führte die Kombination aus CPT-11 und MS-275 zu keiner Verstärkung der Acetylierung an diesen Lysinen, bzw. zu keiner Veränderung der Phosphorylierung des Serins 315. Dies bestätigte den vorangegangenen Befund durch Western Blot, dass MS-275 die Acetylierung von Lysinen der Tetramerisierungsdomäne im Vergleich zur CPT-11-Behandlung nicht weiter steigerte (Abb. 5.9). Anders verhielt es sich mit der Acetylierung des C-Terminus (Abb. 5.10 G und H). Einerseits war der Anteil der acetylierten C-terminalen Proteinfragmente nach Behandlung deutlich höher als bei denen der Tetramerisierungsdomäne. Andererseits wurde die Acetylierung der Lysine 381 und 382 durch die Kombination aus CPT-11 und MS-275 im Vergleich zu der Behandlung mit CPT-11 alleine deutlich verstärkt.

Entinostat verstärkte also hauptsächlich die Modifikation des p53 C-Terminus. Die Veränderungen der post-translationalen Modifikationen von p53 durch CPT-11 und MS-275 waren im Vergleich zur Kontrolle und zur MS-275-Behandlung signifikant. Neben der Acetylierung wurde ebenfalls die Oxidation von Methionin 384 detektiert. Allerdings wurde diese nicht weiter untersucht.



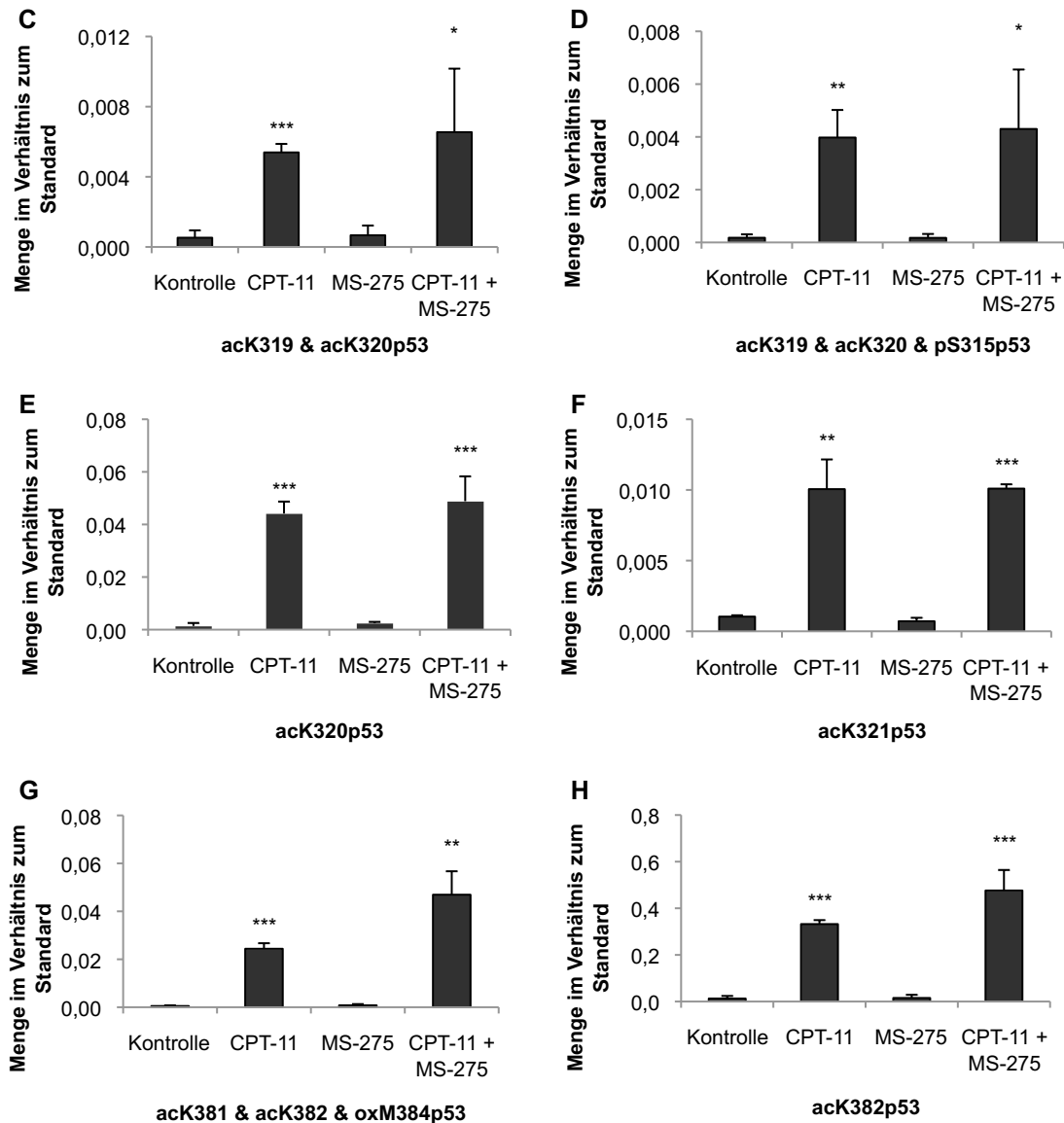


Abbildung 5.10: Durch Massenspektroskopie wird ebenfalls gezeigt, dass p53 nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat stark post-translational modifiziert wird

HCT116 p53wt Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Die Proben wurden anschließend massenspektroskopisch untersucht. In den Abb. A-H wurden die post-translationalen Modifikationen von verschiedenen p53 Proteinfragmenten im Verhältnis zum globalen Standard dargestellt. Der Standard war ein Proteinfragment von p53, dass nicht post-translational modifiziert wurde und leicht detektierbar war. Je nach Länge der identifizierten Fragmente waren diese teilweise mehrfach modifiziert. Es wurde Acetylierung (ac), Phosphorylierung (p) und Oxidation (ox) verschiedener Aminosäurereste in p53 gefunden. Die Messung der behandelten Proben wurden am *Beatson Institute for Cancer Research* in Glasgow, UK im Rahmen eines externen Laborpraktikums und einer laufenden Kooperation durchgeführt. Signifikanzen wurden mittels *T*-Test berechnet (*p*-Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

5.1.8 C-terminal mutiertes p53 war nicht mehr in der Lage mitochondriale Apoptose zu induzieren

Unter den Aspekten, dass die kombinierte Behandlung aus 10 μ M Irinotecan mit 2 μ M Entinostat nach 48 h Behandlung zu einer starken Induktion der

mitochondrialen Apoptose führte und dass vor Allem der C-terminale Bereich von p53 von dieser Kombination beeinflusst wurde, sollte in diesem Abschnitt ein p53-Mutante untersucht werden, deren C-terminale Lysine durch Arginine ersetzt waren (p53 6KR). Damit war diese p53-Mutante im C-Terminus nicht mehr acetylierbar und die Induktion der mitochondrialen Apoptose sollte, entsprechend der Hypothese, geringer ausfallen. Zu diesem Zwecke wurden HCT116 p53^{-/-} Zellen stabil mit p53 6KR transfiziert und über eine Puromycin-Resistenz selektiert. Als Kontrolle wurden HCT116 p53^{-/-} Zellen nur mit GFP transfiziert.

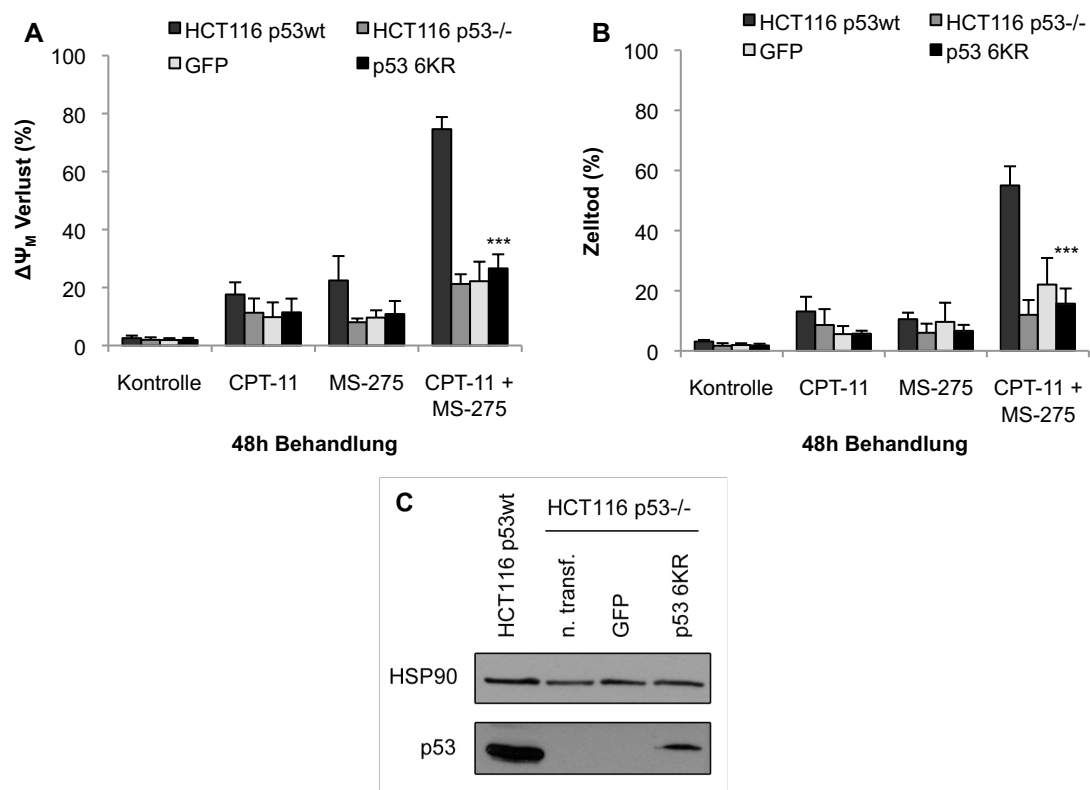


Abbildung 5.11: Die C-terminale p53 6KR Mutante induziert signifikant weniger Apoptose als p53wt nach kombinierter Behandlung mit Irinotecan und Entinostat

HCT116 p53wt und p53^{-/-}, sowie stabile mit GFP oder p53 6KR transfizierte HCT116 p53^{-/-} Zellen wurden 48 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) (A) und der Zelltod (B) gemessen. Die Abbildungen A und B zeigen jeweils die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * > 0,05; ** > 0,01; *** > 0,001) und sind auf die jeweiligen Werte der HCT116 p53wt Zellen bezogen. Mittels Western Blot (C) wurde die intrazelluläre p53 Menge in den vier HCT116 Zelllinien untersucht. Neben den Lysaten aus HCT116 p53wt wurden Lysate aus unbehandelten HCT116 p53^{-/-} (n. transf.) und stabil mit GFP, bzw. p53 6KR transfizierten HCT116 p53^{-/-} Zellen aufgetragen. HSP90 diente als Ladekontrolle.

Die Messung des $\Delta\Psi_M$ Verlustes und des Zelltods nach 48 h Behandlung mit CPT-11 alleine und in Kombination mit MS-275 (Abb. 5.11 A und B) zeigte deutlich, dass sich die p53 6KR-Mutante nicht mehr wie der Wildtyp verhielt. Während in den HCT116 p53wt Zellen wie zuvor bereits beobachtet sehr viele Zellen nach kombinierter

Behandlung mit CPT-11 und MS-275 tot waren und depolarisierte Mitochondrien hatten, waren in den Zellen mit p53 6KR signifikant weniger tote Zellen und weniger $\Delta\Psi_M$ Verlust zu beobachten (p -Werte $< 0,001$). Die Effekte in der p53 6KR-Mutante waren so gering wie in den HCT116 p53^{-/-} Zellen und den stabil mit GFP transfizierten Zellen. P53 schien durch die Mutation der sechs C-terminalen Lysine seinen Einfluss auf den intrinsischen Apoptose-Weg verloren zu haben. Dies lag nicht an der Lokalisation der Mutante. Mitochondriale Fraktionierungen zeigten, dass die Mutante immer noch in der Lage war an Mitochondrien nach Behandlung mit CPT-11 und MS-275 zu lokalisieren (Anhang Abb. A.5). Allerdings schien in den HCT116 Zellen mit der p53 6KR-Mutante kaum BAX an den Mitochondrien zu sein und es fand keine Induktion von NOXA nach genotoxischem Stress statt. Beides war im Vergleich dazu in den HCT116 p53^{wt} Zellen zu beobachten. Die Mengen an BAX wurden durch die Behandlung mit CPT-11 und MS-275 im Wildtyp leicht reduziert. Dies stimmte mit den mRNA-Daten aus dem Abschnitt 5.1.3 überein. Die PUMA-Expression blieb jedoch unverändert durch die Behandlung. Die Induktion von NOXA in den HCT116 p53^{wt} Zellen könnte mit zu der gesteigerten Apoptose nach kombinierter Behandlung mit CPT-11 und MS-275 beigetragen haben.

Da die HCT116 Zellen mit der p53 6KR-Mutante weniger pro-apoptotische Proteine an den Mitochondrien hatten, könnte ein Grund für den geringeren Zelltod und $\Delta\Psi_M$ Verlust im Vergleich zum Wildtyp sein. Parallel zu den Messungen wurde die p53-Proteinexpression der stabil transfizierten Zellen mit den unbehandelten HCT116 p53^{wt} und HCT116 p53^{-/-} verglichen (Abb. 5.11 C). Die HCT116 Zellen mit p53 6KR hatten basal deutlich weniger p53 als der Wildtyp. Diese Unterschiede in den Proteinmengen könnten zum Teil auch für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Allerdings zeigten Fraktionierungen, dass p53 6KR durch die Behandlung mit CPT-11 und MS-275 induziert werden konnte (Anhang Abb. A.5). Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass p53 6KR-, bzw. 7KR-Mutanten weiterhin durch DNA-Schaden aktiviert werden konnten (Feng *et al.*, 2005; Krummel *et al.*, 2005). Allerdings waren die p53-Mutanten in den vorangegangenen Arbeiten weiterhin in der Lage Apoptose auszulösen. Erst die Mutation der beiden Lysine 120 und 164 im Bereich der DNA-Bindungsdomäne in Kombination mit den sechs C-terminalen Lysinen (p53 8KR) führte dazu, dass p53 keine Apoptose mehr auslösen konnte (Tang *et al.*, 2008). Die hier gezeigten Experimente belegten jedoch, dass die C-terminale Acetylierung von p53 alleine eine bedeutenden Rolle für die Induktion der

mitochondrialen Apoptose nach kombinierter Behandlung aus CPT-11 und MS-275 spielte. Eine Mutation der Lysine 120 und 164 war nicht notwendig um die Apoptose-Induktion der p53 6KR-Mutante zu verhindern.

5.2 P53-unabhängige Änderungen des zellulären Metabolismus nach DNA-Schäden

Parallel zur mitochondrialen Apoptose-Antwort wurde auch der zelluläre Metabolismus nach Irinotecan-Behandlung untersucht. HCT116 Zellen haben wie sehr viele andere Tumorzellen auch, einen glykolytischen Metabolismus (Donohoe *et al.*, 2012; Faubert *et al.*, 2013). Allerdings haben diese Zellen immer noch das Potential die oxidative Phosphorylierung als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen zu steigern (Loiseau *et al.*, 2009; Desquiret *et al.*, 2006). Der Metabolismus ist ein wesentlicher Teil der Zellvitalität und soll nun im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

5.2.1 MTT-Tests und die Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs zeigten eine p53-unabhängige Steigerung des Metabolismus

Im Abschnitt 5.1 zeigten sich deutliche p53-abhängige Effekte auf die Zellvitalität. Der zelluläre Metabolismus wird ebenfalls an mehreren Stellen von p53 reguliert. P53-abhängige Effekte auf die Regulation des Metabolismus nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat waren daher zu erwarten.

Um den Stoffwechsel der beiden HCT116 Zelllinien zu messen wurden MTT-Tests durchgeführt. Der MTT-Test wird häufig als Proliferationsassay verwendet um die Toxizität verschiedener Substanzen in Zellsystemen zu testen (Mosmann, 1983; Yamaue *et al.*, 1991). Allerdings beruht der Umsatz des Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) auf der Menge an zytosolischem Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und auf der Aktivität der Succinat-DH (Berridge und Tan, 1993). Damit gibt der MTT-Test eine Aussage über den zellulären Metabolismus. Um den Einfluss unterschiedlicher Proliferation auf die MTT-Tests (Abb. 5.12 A und C) nach 24, bzw. 48 h Behandlung mit 10 μ M Irinotecan und 2 μ M Entinostat zu berücksichtigen, wurde die Zellzahl in parallelen Ansätzen (Abb. 5.12 B und D) mit einem *Coulter Counter* bestimmt und anschließend der MTT-Umsatz pro Zellzahl bestimmt (Abb. 5.12 E und F).

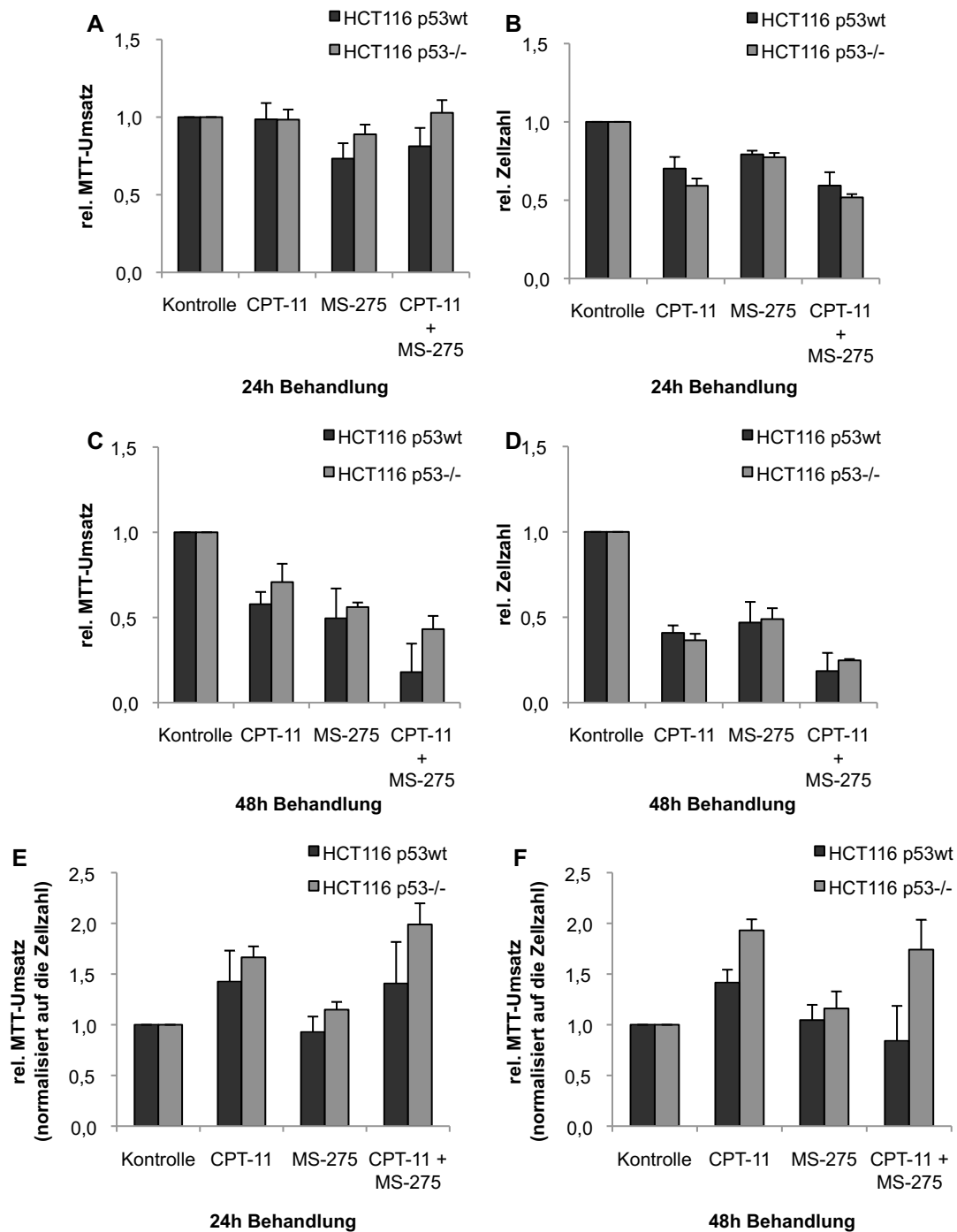


Abbildung 5.12: Der MTT-Umsatz in HCT116 Zellen wird durch die Irinotecan-Behandlung gesteigert

HCT116 p53wt und HCT116 p53-/- wurden 24, bzw. 48 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Zu jeder Behandlung wurden in parallelen Experimenten die Zellzahl (B und D) und der MTT-Umsatz (A und C) bestimmt. Alle Werte wurden auf die Kontrolle normiert. Anschließend wurde daraus der relative MTT-Umsatz pro Zellzahl (E und F) ermittelt. Die Abb. A-F zeigen die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

Im MTT-Test war nach 24 h Behandlung noch kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen zu sehen. Auch waren keine Unterschiede zwischen den beiden HCT116 Zelllinien zu erkennen. Anhand der Zellzahl zeigten sich jedoch bereits erste Unterschiede (Abb. 5.12 B). Die Behandlung mit CPT-11 führte, durch

die Inhibition der Topoisomerase I, zu p53-unabhängigen DNA-Schäden und zum Zellzyklus-Arrest. Bereits nach 24 h kam es zu einer Reduktion der Zellzahl um 30%. Dies war in HCT116 p53wt und p53-/- Zellen vergleichbar.

Nach 48 h Behandlung zeigten sich in der kombinierten Behandlung aus CPT-11 und MS-275 p53-abhängige Effekte im MTT-Test und der Zellzahl (Abb. 5.12 C und D). Die Zellzahl und der MTT-Umsatz wurden in den HCT116 p53wt Zellen um 80% reduziert. In den HCT116 p53-/- Zellen wurde die Zellzahl um 75%, der MTT-Umsatz aber nur um 65% reduziert. Diese Beobachtung passt zu der zuvor beschriebenen Induktion der mitochondrialen Apoptose durch p53 nach 48 h kombinierter Behandlung (Abb. 5.1). Die Einzelbehandlung mit CPT-11 führte dagegen in beiden Zelllinien zu einer Reduktion der Zellzahl um 60% und einer Reduktion des MTT-Umsatzes um 40%, verglichen mit der Kontrolle. Die Behandlung mit MS-275 alleine führt ebenfalls in beiden HCT116 Zelllinie zu einer Reduktion der Zellzahl und des MTT-Umsatzes um rund 50%.

Nach Berechnung des MTT-Umsatzes pro Zellzahl nach 24 und 48 h Behandlung, wurde deutlich, dass CPT-11 den Umsatz von MTT in beiden Zelllinien steigerte (Abb. 5.12 E und F). Der Umsatz war zu beiden Zeitpunkten um 50 bis 90% erhöht. Dies könnte sowohl durch eine höhere Aktivität der Atmungskette, als auch des Zitratzyklus zustande gekommen sein. Die Succinat-DH (Komplex II der Atmungskette) ist Teil beider Stoffwechselwege und ein zentraler Enzymkomplex im zellulären Metabolismus. P53 hatte darauf kaum einen Einfluss und nur nach 48 h Behandlung mit CPT-11 in Kombination mit MS-275 wurde ein Unterschied zwischen den beiden HCT116 Zelllinien deutlich (Abb. 5.12 F). Da nach 48 h Behandlung in den HCT116 p53wt Zellen bereits sehr viele apoptotische Zellen vorlagen, waren die Messwerte nach 24 h Behandlungszeit aussagekräftiger.

Diese Ergebnisse waren unerwartet und führten dazu, dass der mitochondriale Metabolismus genauer untersucht wurde. Zunächst wurde der Sauerstoffverbrauch der HCT116 p53wt und p53-/- Zellen nach 24 und 48 h Behandlung mit CPT-11 und MS-275 bestimmt (Abb. 5.13). Beide Zelllinien hatten bereits nach 24 h Behandlung mit CPT-11 einen doppelt so hohen Sauerstoffverbrauch wie die Kontrolle. Dieser Effekt war hoch signifikant (p -Wert $< 0,001$ in HCT116 p53wt; $< 0,01$ in HCT116 p53-/-). Die kombinierte Behandlung mit MS-275 hatte kaum Auswirkungen und führte nur zu leichten Änderungen im Bereich von 10%. Nach 48 h Behandlung mit Irinotecan stieg der Sauerstoffverbrauch in den HCT116 p53wt und p53-/- Zellen auf

das 2,5-fache der Kontrolle. Die gesteigerte Respiration war in beiden Zelllinien nach Behandlung mit CPT-11 alleine und in Kombination mit MS-275 hoch signifikant (p -Wert $< 0,001$). Die Behandlung mit Entinostat führte zu beiden Zeiten in beiden Zelllinien nur zu geringen Änderungen des Sauerstoffverbrauchs. Die hier beobachteten Effekte waren, analog zu den MTT-Tests, nahezu p53-unabhängig und beruhten wahrscheinlich rein auf den durch Irinotecan induzierten Schaden. Die Unterschiede nach 48 h Behandlungszeit zwischen den MTT-Tests und dem Sauerstoffverbrauch lagen darin begründet, dass für den Sauerstoffverbrauch nur adherente, vitale Zellen untersucht wurden. Im MTT-Test wurden die gesamten Ansätze, also auch zum Teil bereits tote Zellen, betrachtet.

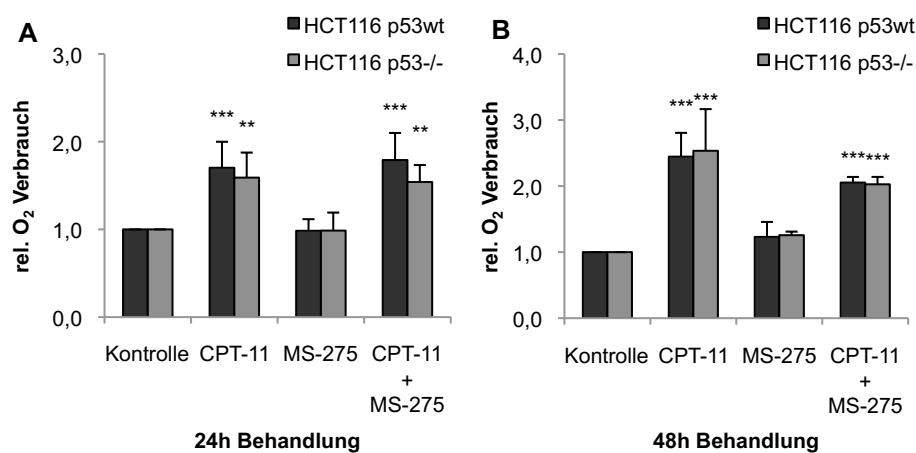


Abbildung 5.13: Der Sauerstoffverbrauch vom HCT116 Zellen nach Behandlung mit Irinotecan und Entinostat ist deutlich gesteigert

HCT116 p53wt und HCT116 p53-/- wurden 24 (A), bzw. 48 h (B) mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde anschließend mittels einer Clark Elektrode gemessen. Alle Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Abb. A und B zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$) und sind auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

Die für p53 beschriebene Regulation des Metabolismus spielte in beiden Experimenten (Abb. 5.12 und 5.13) kaum eine Rolle. Es wäre zu erwarten gewesen, dass Zellen mit p53 wesentlich stärker ihre oxidative Phosphorylierung steigern können als p53-negative Zellen (Vousden and Ryan, 2009; Gottlieb and Vousden, 2010). Da die Steigerung des Metabolismus alleine durch Irinotecan hervorgerufen wurden, lag eine Beteiligung der Kinasen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein* (ATR) nahe. Durch DNA-Schäden verursachte Änderungen des Stoffwechsels wurden bereits in der Literatur beschrieben (Rudolf *et al.*, 2012; Gerwitz, 2013) und sind häufig eine Anpassung an den genotoxischen Stress und schützen Tumorzellen vor weiteren Schäden (Loiseau

et al., 2009). Da Tumorzellen, trotz ihres glykolytischen Metabolismus, eine relativ hohe respiratorische Kapazität erhalten haben, können diese Anpassungen schnell und reversibel sein (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Allerdings führten kürzere Behandlungszeiten im Bereich von 1 bis 4 h noch zu keiner Veränderung des Sauerstoffverbrauchs in HCT116 p53wt Zellen (Anhang Abb. A.6). Dies legte nahe, dass die Steigerung der Respiration durch die CPT-11 Behandlung eine gewisse Zeit in Anspruch nahm und keine schnelle, sondern langfristige Adaption an den DNA-Schaden war.

MS-275 hatte kaum einen Einfluss auf den zellulären Metabolismus und führte zu keiner Verstärkung potentiell p53-abhängiger Effekte. Für die weiteren Untersuchungen des zellulären Metabolismus wurden daher nur noch Irinotecan verwendet. Da die beobachteten Effekte von p53 unabhängig waren, wurden einige Experimente nur in HCT116 p53wt Zellen durchgeführt. Außerdem wurden die weiteren Experimente nur bis 24 h Behandlungszeit verfolgt, da zu diesem Zeitpunkt bereits die Änderung des Metabolismus präsent, die mitochondriale Apoptose in den HCT116 p53wt Zellen jedoch noch nicht voll ausgeprägt war.

Um eine Beteiligung von ATM am gesteigerten Metabolismus nachzuweisen, wurde der MTT-Umsatz pro Zellzahl nach 24 h Behandlung mit 10 μ M CPT-11 alleine und in Kombination mit 10 μ M des ATM-Inhibitors KU55933 gemessen (Anhang Abb. A.7). In beiden Zelllinien führte die Behandlung mit CPT-11 zu einem doppelt so hohen MTT-Umsatz pro Zellzahl als in der Kontrolle. Die Kombination mit KU55933 verringerte den MTT-Umsatz auf das 1,4-fache der Kontrolle und reduzierte damit den Wert der CPT-11-Einzelbehandlung um 60% (p -Wert < 0,05 für HCT116 p53wt). Die Behandlung mit KU55933 alleine führte zu keiner Änderung des MTT-Umsatzes.

5.2.2 Irinotecan reduzierte die mRNA-Expression mitochondrialer Gene

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass der mitochondriale Metabolismus durch die Behandlung mit Irinotecan stark verändert wurde (Abschnitt 5.2.1). Dabei schien die Atmungskette eine zentrale Rolle zu spielen. In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, inwieweit die Multienzymkomplexe der Atmungskette durch die Behandlung mit 10 μ M Irinotecan beeinflusst wurden. Die mRNA Expression je einer Untereinheit von Komplex I (*NDH* oder auch *ND1*; Untereinheit (UE) 1 der NADH-Dehydrogenase) und IV (*COX2* oder auch *COII*; UE 2 der Cytochrom-c-Oxidase), sowie des Kofaktors Cytochrom *b* (*CYTB* oder auch *Cyt b*) wurde nach 12 und 24 h

Behandlung in HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen untersucht (Abb. 5.14). In beiden HCT116 Zelllinien sank die Expression der untersuchten mRNAs nach CPT-11-Behandlung. Allerdings war dieser Effekt in den HCT116 p53^{-/-} Zellen stärker zu beobachten. Eine Erklärung dafür konnte sein, dass Irinotecan genauso wie andere Camptothecin-Derivate sowohl die nukleare (TOP1), als auch die mitochondriale Topoisomerase-1 (TOP1mt) inhibierte und somit zu Schäden in beiden Genomen führen (Pommier, 2006; Diaz und Wellinger, 2009). Diese Schäden würden folglich zu einer geringeren Genexpression und geringeren mRNA-Mengen führen. HCT116 p53wt Zellen könnten davon weniger betroffen sein, da beschrieben wurde, dass p53 mit der mitochondrialen DNA-Polymerase γ (DNA pol γ) direkt interagiert und Mitochondrien damit vor DNA-Schäden schützt (Achantia *et al.*, 2005).

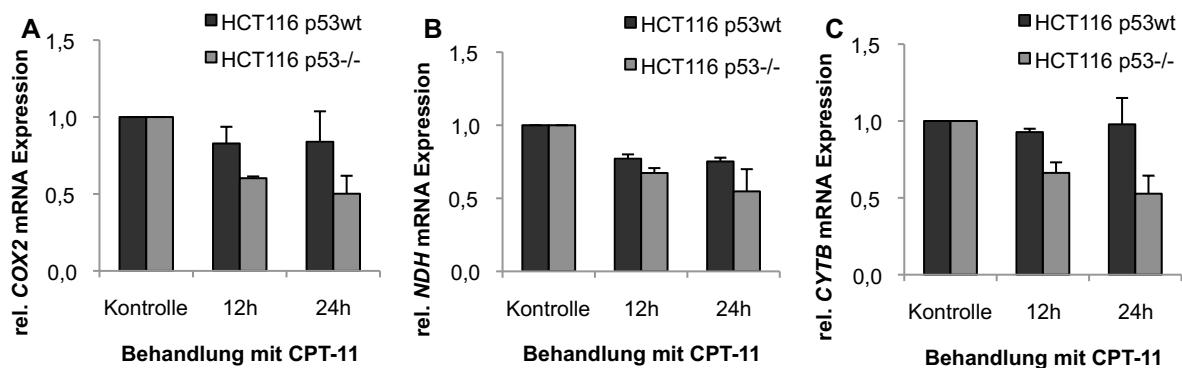


Abbildung 5.14: Die relative mRNA-Expression mitochondrialer Gene nach Irinotecan Behandlung ist niedriger als in unbehandelten Zellen

HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen wurden 12, bzw. 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Durch qRT-PCR wurde die mRNA Expression der Gene COX2 (A), NDH (B) und CYTB (C) im Vergleich zu β -2-Microglobulin gemessen und die Werte nach der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Methode berechnet. Anschließend wurden die Werte auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Jürgen Sonnemann durchgeführt.

5.2.3 Verschiedene Inhibitoren waren in der Lage den Metabolismus zu beeinflussen

In diesem Abschnitt wurden HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen 24 h mit 10 μ M CPT-11 alleine und in Kombination mit den Komplex-I-Inhibitoren Rotenon oder Chloramphenicol behandelt (Abb. 5.15 A). Chloramphenicol ist ein Antibiotikum, dass sowohl bakterielle, als auch mitochondriale Ribosomen blockiert und damit die Proteintranslation hemmt (McKee *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). HCT116 p53wt Zellen wurden zusätzlich mit dem Komplex-II-Inhibitor 2-Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) alleine und in Kombination mit CPT-11 behandelt (Abb. 5.15 B). Damit sollte eine

Beteiligung der mitochondrialen Translation untersucht werden und direkt mit den Effekten von OXPHOS-Inhibitoren verglichen werden.

Auch in diesem Experiment induzierte Irinotecan nach 24 h Behandlung in beiden HCT116 Zelllinien einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs auf 200% der Kontrolle (Abb. 5.15). Die Rotenon-Einzelbehandlung senkte den Sauerstoffverbrauch um 40%, wohingegen die Behandlungen mit Chloramphenicol oder TTFA den Sauerstoffverbrauch nur um 20% verglichen mit der Kontrolle senkte. In den Kombinationen aus Rotenon, Chloramphenicol oder TTFA mit CPT-11 lag der zelluläre O₂-Verbrauch bei 90% (Rot.), bzw. 120% (Chl. und TTFA) der Kontrolle. Die Induktion des Metabolismus durch Irinotecan konnte mit allen drei getesteten Substanzen reduziert werden. Für Rotenon und Chloramphenicol war dieser Effekt signifikant (p -Werte < 0,05 für beide Substanzen in HCT116 p53wt; p -Wert < 0,01 für Rotenon in HCT116 p53^{-/-}).

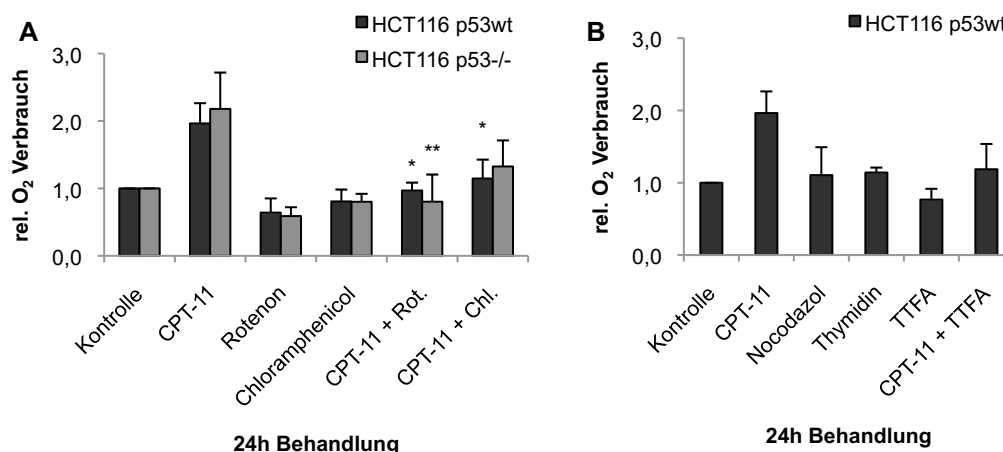


Abbildung 5.15: Verschiedene mitochondriale Inhibitoren senken den zellulären Sauerstoffverbrauch

HCT116 p53wt und HCT116 p53^{-/-} wurden 24 h (A) mit 10 µM Irinotecan (CPT-11) mit 100 nM Rotenon (Rot.) und 100 µg/ml Chloramphenicol (Chl.) alleine und in Kombination mit 10 µM CPT-11 behandelt. Zusätzlich wurden HCT116 p53wt Zellen 24h (B) mit 0,1 µg/ml Nocodazol, 1 mM Thymidin und mit 10 µM Irinotecan (CPT-11) alleine oder in Kombination mit 100 µM 2-Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) behandelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde anschließend mittels einer Clark Elektrode gemessen. Alle Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Abb. A und B zeigen die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Die Werte der Kontrolle und CPT-11-Behandlung in Abb. B sind identisch mit denen der Abb. A. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die Irinotecan-Einzelbehandlung bezogen.

Die Blockierung der mitochondrialen Proteintranslation hatte in HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen den gleichen Effekt wie die Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung und wirkte sich direkt auf den Stoffwechsel aus. Die Versuche mit Chloramphenicol im Zusammenhang mit den Daten zur mRNA-Expression (Abb. 5.14) zeigten, dass die mitochondriale Translation an der Induktion des zellulären Stoffwechsels nach

CPT-11-Behandlung beteiligt sein könnte. Auch Houtkooper *et al.* (2013) konnten durch Versuche mit Chloramphenicol zeigen, dass die Respiration reduziert wurde und es zu einer Missbalance zwischen nuklear und mitochondrial kodierten Proteinen in den Mitochondrien kam. Es sollte in diesen Versuchen weiterhin gezeigt werden, ob ein Zellzyklus-Arrest in der G1 oder G2/M-Phase ausreichend war um in HCT116 p53wt Zellen den Sauerstoffverbrauch zu steigern (Abb. 5.15 B). Die Zellen wurden dazu mit Thymidin oder Nocodazol behandelt. Für beide Substanzen zeigte sich jedoch keine Änderung des rel. O₂-Verbrauchs. Damit wurde nochmals deutlich, dass tatsächlich der DNA-Schaden durch Irinotecan eine entscheidende Rolle für die Steigerung des Metabolismus spielte.

5.2.4 Mehrere DNA-schädigende Chemotherapeutika waren in der Lage den Sauerstoffverbrauch zu steigern

Die bisherigen Daten zeigten, dass der gesteigerte Metabolismus eine Folge des durch Irinotecan induzierten DNA-Schadens war. Konsequenterweise mussten auch andere DNA-schädigende Chemotherapeutika in der Lage sein einen ähnlichen Effekt in Tumorzellen hervorzurufen. Um dies zu untersuchen wurden HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen sowie K562 Zellen 24 h mit 10 µM Irinotecan, 0,5 mM Hydroxyurea oder 1 µM Doxorubicin behandelt (Abb. 5.16). Zusätzlich wurden HCT116 p53wt Zellen 24 h mit 5 µM Oxaliplatin und 5 µM 5-Fluoruracil (5-FU) behandelt (Abb. 5.16 A). Alle untersuchten Substanzen steigerten den relativen Sauerstoffverbrauch in den drei getesteten Zelllinien. Allerdings konnten nicht alle Chemotherapeutika den Sauerstoffverbrauch so stark induzieren wie CPT-11. Irinotecan war in der Lage den Metabolismus um 100% zu steigern (Abb. 5.16). Hydroxyurea und Doxorubicin führten jedoch nur zu etwa 50% Steigerung. Interessanterweise war die relative Steigerung des Sauerstoffverbrauchs zwischen den Zelllinien sehr ähnlich. Hoch signifikant war jedoch nur die Behandlung mit Irinotecan (*p*-Werte < 0,001 in HCT116 p53wt; < 0,01 in HCT116 p53^{-/-} und K562 Zellen). In den HCT116 Zellen waren die Behandlungen mit Hydroxyurea (*p*-Werte < 0,01 in HCT116 p53wt; < 0,05 in HCT116 p53^{-/-}) und Doxorubicin signifikant (*p*-Wert < 0,05 in HCT116 p53^{-/-}). Die weiteren Behandlungen in K562 Zellen waren nicht signifikant. Oxaliplatin steigerte den Sauerstoffverbrauch nur um 20%, wohingegen 5-FU eine Steigerung um 55% verursachte (Abb. 5.16 A). Im Rahmen der Varianzen zwischen den Messreihen waren beide Behandlungen in den HCT116 p53wt Zellen jedoch nicht signifikant.

Dieser Versuch unterstrich, dass eine DNA-schädigende Chemotherapie den Metabolismus der Zelle änderte und auch in anderen Zellen als den HCT116 zu beobachten war. Irinotecan war unter den verwendeten Substanzen am effektivsten. Der genaue Grund für die schwächere Wirkung der anderen Chemotherapeutika war nicht genau bekannt, beruhte aber wahrscheinlich auf der Art des induzierten DNA-Schadens und der Wirkungsweise der jeweiligen Substanz.

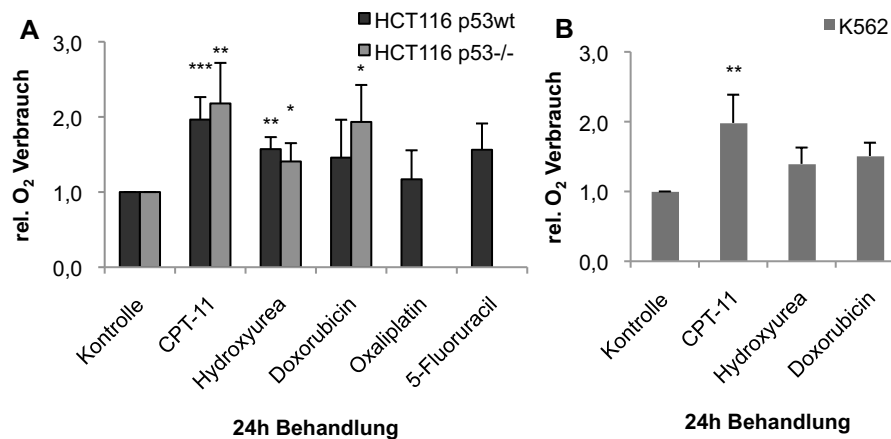


Abbildung 5.16: Mehrere Chemotherapeutika steigern den zellulären Sauerstoffverbrauch in HCT116 und K562 Zellen

HCT116 p53wt und HCT116 p53-/- (A) wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) 0,5 mM Hydroxyurea und 1 μ M Doxorubicin behandelt. Zusätzlich wurden HCT116 p53wt Zellen 24 h mit 5 μ M Oxaliplatin und 5 μ M 5-Fluoruracil behandelt. K562 Zellen (B) wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11), 0,5 mM Hydroxyurea oder 1 μ M Doxorubicin behandelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde anschließend mittels einer Clarke Elektrode gemessen. Alle Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Abb. A und B zeigen die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Die Werte der Kontrolle und CPT-11-Behandlung in dieser Abbildung sind identisch mit denen der Abb. 5.17 A. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (p -Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

5.2.5 Die Behandlung mit Irinotecan induzierte globale Änderungen des zellulären Metabolismus

MTT-Tests und der veränderte Sauerstoffverbrauch nach Irinotecan-Behandlung zeigten, dass sich sowohl die Aktivität der Atmungskette, als auch der Zitratzyklus veränderte. Globale Änderungen des Metabolismus schienen als Folge des DNA-Schadens aufzutreten. Um dies zu klären wurden HCT116 p53wt und p53-/- Zellen mit 10 μ M Irinotecan behandelt und deren Lysate, sowie das überstehende Medium durch Massenspektroskopie analysiert. Im Rahmen dieses Experimentes wurde auch die Wirkung von Entinostat alleine und in Kombination mit CPT-11 untersucht. Allerdings hatte der HDACi, wie zuvor, keinerlei Auswirkung auf den Metabolismus (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden die Änderungen mehrerer Stoffwechselzwischenprodukte nach 12 und 24 h Behandlungszeit untersucht. Da zu

beiden Zeitpunkten gleiche Effekte zu beobachten waren, diese nach 24 h allerdings deutlicher ausfielen, wurden nur die Werte der 24 h Behandlung abgebildet (Anhang Abb. A.8-A.10). In der Abbildung 5.17 wurden alle Veränderungen graphisch zusammengefasst. Sofern im Folgenden nicht darauf hingewiesen wird, waren die Veränderungen in beiden HCT116 Zelllinien gleich.

Nach Behandlung mit CPT-11 nahmen die Zellen mehr Glukose aus dem Medium auf und wandelten diese in höhere intrazelluläre Mengen an Glukose-6-phosphat und Phosphoenolpyruvat um. Glukose-6-phosphat kann weiter in der Glykolyse oder im Pentosephosphatweg (PPW) verstoffwechselt werden. Die Aktivierung des PPW würde zu höheren Mengen an reduziertem Glutathion führen, welches zum Abbau der intrazellulären ROS genutzt würde (Baffy *et al.*, 2011). Die Intrazellulären Glukosespiegel waren in HCT116 p53^{-/-} Zellen durch die Behandlung mit CPT-11 unverändert. In HCT116 p53^{wt} Zellen waren sie geringer nach 24 h Behandlung als in der Kontrolle. Ein hoher Glukoseumsatz würde die gleichbleibenden, bzw. geringeren Glukosemengen, trotz der gesteigerten Glukoseaufnahme erklären. HCT116 p53^{wt} Zellen schienen dabei mehr Glukose zu nutzen als p53 negative Zellen. In beiden Zelllinien führten die gestiegene Glykolyse und der gesteigerte Sauerstoffverbrauch zu höheren ATP-Mengen. Die Menge an intrazellulärem ATP bestimmt ob Zellen nach Schäden Nekrose oder Apoptose auslösen. Hohe ATP-Spiegel begünstigen den Prozess der Apoptose (Nicotera *et al.*, 1998). Dies könnte mit ein Grund gewesen sein, dass die HCT116 Zellen hauptsächlich den mitochondrialen Apoptose-Weg als Folge des genotoxischen Stresses starteten.

Die Pyruvataufnahme aus dem Medium war nach Behandlung gesteigert. Die intrazellulären Mengen an Pyruvat waren, ähnlich zu den Glukosespiegeln in den HCT116 p53^{-/-} durch CPT-11 unverändert und in den HCT116 p53^{wt} reduziert. Pyruvat kann, je nach Art des Stoffwechsels, zur Acetyl-CoA oder zu Laktat abgebaut werden. Die vorliegenden Daten zeigten, dass in den HCT116 Zellen beides passierte. Die Behandlung mit CPT-11 bewirkte, dass beide Zelllinien mehr Laktat ausschieden und mehr Acetyl-CoA bildeten. Die intrazellulären Laktatspiegel wurden in HCT116 p53^{-/-} Zellen reduziert und in HCT116 p53^{wt} Zellen gesteigert. Die größere Menge an verbrauchter Glukose und Pyruvat schien also um Teil in Laktat umgewandelt zu werden.

Die durch CPT-11 gesteigerten Acetyl-CoA-Mengen führten zu einer höheren Zitratzyklusaktivität. Dadurch stiegen die intrazellulären Spiegel an Zitrat, cis-

Aconitat, α -Ketoglutarat (α -KG) und Malat. Höhere Zitratmengen und Umsatz in Isozitat (nicht untersucht) führen zu gesteigerten NADPH-Mengen und Lipidbiosynthese (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011). Von beiden Zelllinien wurde nach Behandlung mehr cis-Aconitat, α -KG und Malat in das Medium sekretiert. Generell schien der gesamte Zitratzyklus durch CPT-11 hochaktiv zu sein.

Mehr Glutamin wurde aus dem Medium aufgenommen und die intrazellulären Glutaminmengen waren erhöht. Glutamin wird im Zitratzyklus abgebaut und zu Malat und Oxalacetat (nicht untersucht) umgewandelt, welche beide für Lipid-Synthese genutzt werden können. Über α -KG wird Glutamin auch in Glutamat umgewandelt. Durch CPT-11-Behandlung stiegen die zellulären Mengen an α -KG an, die Mengen an Glutamat blieben konstant. Jedoch erhöhte sich die Freisetzung von Glutamat in das Medium. Glutamat wurde in den HCT116 vermutlich auch verwendet um reduziertes Glutathion zu produzieren. Sowohl die Mengen an reduziertem (GSH) als auch oxidiertem Glutathion (GSSG) waren in den HCT116 Zellen nach 24 h Behandlung erhöht. Der Grund für die gesteigerten Mengen an GSSG lag in den höheren ROS-Spiegeln aus der Atmungskette welche GSH teilweise oxidierten. Neben der gesteigerten Glykolyse und Glutaminolyse, wurden von beiden HCT116 Zellen nach Irinotecan-Behandlung auch mehr Aminosäuren aufgenommen und umgesetzt. Darunter waren Arginin, Cystein, Methionin, Prolin, Serin und Tryptophan (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden die Aminosäuren wahrscheinlich nicht nur als Energiequelle sondern auch als Baustein für neue Biomoleküle genutzt. Neuere Studien belegten, dass die Aufnahme von Serin in Tumorzellen hoch ist und für p53 negative Zellen sogar essentiell. Serin wird dabei für die Nukleotidsynthese benötigt (Maddocks *et al.*, 2013; Labuschagne *et al.*, 2014).

Dieses Experiment belegte, dass nicht nur die Atmungskette durch Irinotecan beeinflusst wurde, sondern dass der gesamte Metabolismus gesteigert wurde. Glykolyse und Glutaminolyse waren erhöht und führten zu einer höheren Zitratzyklusaktivität. Diese führte zur gesteigerten oxidativen Phosphorylierung und ATP-Produktion. Durch den hoch aktiven Zitratzyklus wurden die Grundbausteine für mehrere Biosynthesewege bereitgestellt. Neue Biomoleküle werden nicht nur für das Zellwachstum benötigt, sondern auch um Schäden zu beheben. Der gesteigerte Metabolismus kann daher als Stressanpassung an die DNA-schädigende Chemotherapie dienen.

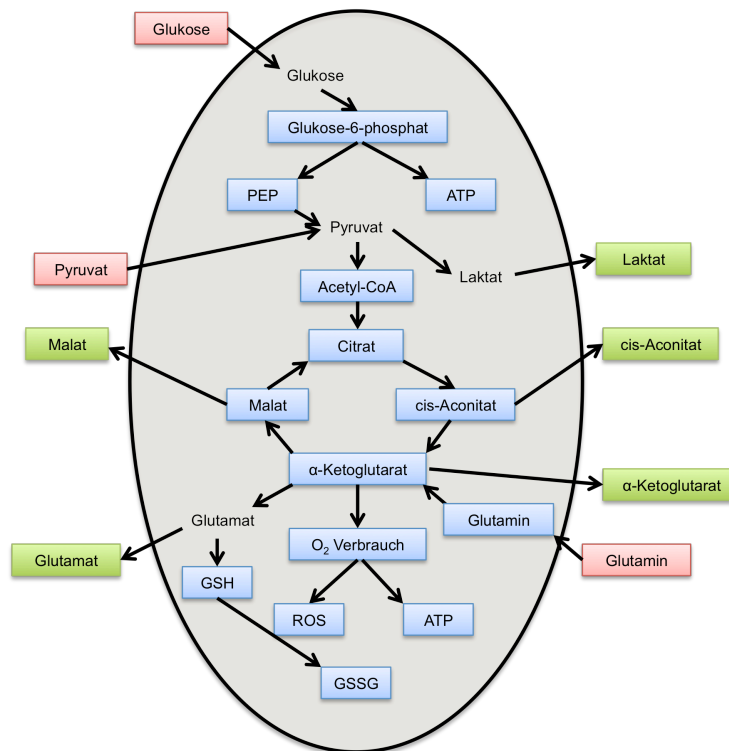


Abbildung 5.17: Der Nährstoffverbrauch und die -nutzung sind nach Irinotecan-Behandlung verändert

Die Abbildung fasst alle beobachteten Veränderungen des Metabolismus nach 24 h Behandlung mit 10 µM Irinotecan in beiden HCT116 Zelllinien zusammen. Nährstoffe die verstärkt aus dem umgebenden Medium aufgenommen wurden, sind in rot dargestellt und Nährstoffe die vermehrt sekretiert wurden, sind in grün dargestellt. Blau wurden alle Stoffwechselzwischenprodukte unterlegt, die nach Behandlung intrazellulär erhöht vorlagen. Des Weiteren wurde die Verbindung zwischen den Nährstoffen und dem gesteigerten Sauerstoffverbrauch dargestellt. Die zugehörigen Diagramme sind im Anhang (Abb. A.8-A.10) zu finden.

5.2.6 Geringere Glukoseverfügbarkeit verstärkte den toxischen Effekt von Irinotecan

Ob nun der gesteigerte Metabolismus einen schützenden während Effekt der Chemotherapie hatte, sollte anhand des nächsten Versuchs genauer untersucht werden. Von Lee *et al.* (2012) wurde darüber berichtet, dass die Kombination aus Nährstoffmangel und Chemotherapie dauerhaft Tumore bekämpft. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass kurzzeitiges Hungern normales Gewebe vor Chemotherapie schützt, Tumorgewebe jedoch nicht (Raffagello *et al.*, 2008; 2010). Alle bisherigen Experimente dieser Arbeit wurden in *high glucose* DMEM (5 g/l Glukose) durchgeführt. Nun sollte die toxische Wirkung von Irinotecan in *low glucose* DMEM (1 g/l) untersucht werden. 1 g/l Glukose ist eine physiologische Konzentration und noch kein Mangelmedium. Allerdings sollte durch die verringerte Glukoseverfügbarkeit die Möglichkeit zur Steigerung des Stoffwechsels geringer sein und nach längeren Inkubationszeiten die Glukosemenge limitierend werden. Die

Messung des Sauerstoffverbrauchs in HCT116 p53wt Zellen zeigte entgegen der Erwartung kaum Unterschiede zwischen den beiden Glukosekonzentrationen. CPT-11 war sowohl in DMEM mit *high* und *low glucose* in der Lage den O₂-Verbrauch stark zu steigern (Anhang Abb. A.11).

Die Versuche zeigten, dass bereits nach 24 h Behandlung mit 10 µM Irinotecan HCT116 p53wt Zellen in *low glucose* DMEM einen signifikant höheren $\Delta\Psi_M$ Verlust hatten, als in *high glucose* DMEM (Abb. 5.18 A; *p*-Wert < 0,05). Der Zelltod hingegen zeigte weniger deutliche Unterschiede zwischen den beiden Medien (Abb. 5.18 B). Nach 48 h Behandlung mit CPT-11 war der Unterschied in HCT116 p53wt Zellen zwischen *high* und *low glucose* DMEM hoch signifikant (Abb. 5.18 C und D; *p*-Werte < 0,01). In *high glucose* DMEM hatten HCT116 p53wt Zellen gerade einmal 10% $\Delta\Psi_M$ Verlust und 10% Zelltod. In *low glucose* DMEM dagegen lag der $\Delta\Psi_M$ Verlust und Zelltod bei 30%. Zu beiden Zeitpunkten wurde die Apoptose in den HCT116 p53^{-/-} Zellen kaum von der unterschiedlichen Glukosemenge im Medium beeinflusst. Die mitochondriale Apoptose war auch unter diesen Versuchsbedingungen p53-abhängig. Das die HCT116 p53wt Zellen mehr Glukose umsetzten als die p53-negativen Zellen zeigte sich bereits in der massenspektroskopischen Auswertung der Stoffwechselzwischenprodukte (Abschnitt 5.2.5). Durch den höheren Glukoseumsatz waren die HCT116 p53wt Zellen abhängiger von der Glukosekonzentration im DMEM und konnten darüber leichter für die Behandlung mit Irinotecan sensibilisiert werden. Es wurde ebenfalls die Kombination aus CPT-11 und MS-275 in *high* und *low glucose* DMEM untersucht (Anhang Abb. A.12). Allerdings zeigte sich dabei weder nach 24 h, noch nach 48 h Behandlung eine signifikante Verstärkung des toxischen Effektes.

Nichtsdestotrotz ergaben sich dadurch zwei Möglichkeiten die p53-abhängige mitochondriale Apoptose in HCT116 Zellen zu steigern. Zum Einen, durch gesteigerte post-translationale Modifikationen von p53 und zum Anderen durch vorhergehende Einflussnahme auf den Metabolismus und die Verfügbarkeit von Nährstoffen. Die Apoptose in HCT116 p53^{-/-} Zellen wurde durch den Einsatz von TTFA und Rotenon in Kombination mit CPT-11 verstärkt (Daten nicht gezeigt). Für diese Zellen könnte eine Regulation der Atmungskette vielversprechend sein um die Therapie effizienter zu machen.

Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass individualisierte Therapien nötig sind und dass auch der Stoffwechsel eine entscheidende Rolle für die Effektivität einer Therapie spielen kann.

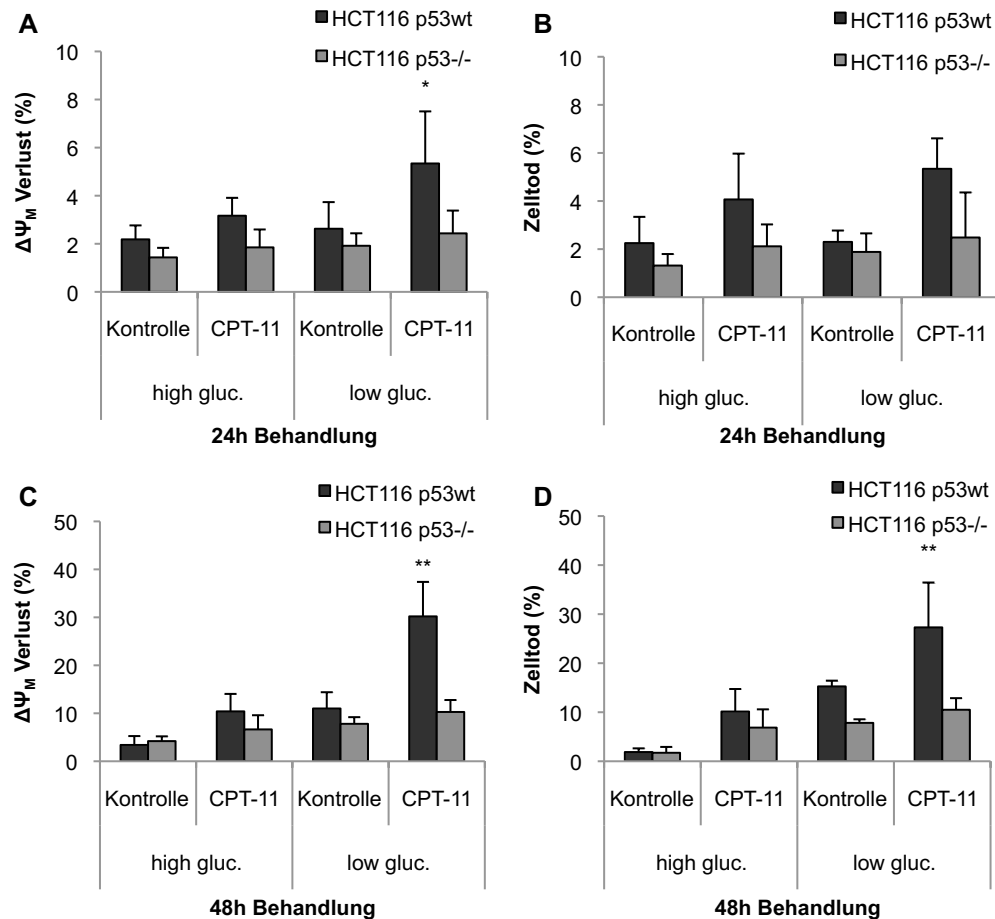


Abbildung 5.18: Niedrige der Glukoseverfügbarkeit während der Behandlung mit Irinotecan steigerte die Toxizität

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden in DMEM mit niedrigen (*low gluc.*; 1 g/l) und hohen (*high gluc.*; 5 g/l) Glukosemengen 24, bzw. 48h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) (A und C) und Zelltod (B und D) gemessen. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (*p*-Wert: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001) und sind auf die jeweilige Behandlung in *high gluc.* DMEM bezogen.

6 Diskussion

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel gestartet, die Vitalität von Tumorzellen nach DNA-schädigender Chemotherapie zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass zwei zeitgleiche Effekte ausgelöst wurden. Einerseits konnte durch den Topoisomerase I-Inhibitor Irinotecan (CPT-11) p53-abhängige Apoptose induziert werden. Andererseits wurde durch den DNA-Schaden der zelluläre Metabolismus p53-unabhängig stark erhöht. Dabei konnte durch den Einsatz des Histondeacetylase Inhibitors (HDACi) Entinostat (MS-275) die Apoptose gesteigert werden, der Metabolismus blieb dadurch jedoch unbeeinflusst.

6.1 Die C-terminale Acetylierung von p53 beeinflusste das Ausmaß der Apoptose nach genotoxischem Stress

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit den toxischen Folgen der DNA-schädigenden Chemotherapie. Dazu wurden HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen mit Irinotecan behandelt. Um die post-translationale Modifikation von p53 zu steigern, wurden die Zellen zusätzlich mit Entinostat behandelt. Durch Irinotecan kam es in beiden HCT116 Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und zu einer ATM-Aktivierung (Haug *et al.*, 2008).

P53 wird infolge von Stress durch mehrere Histonacetyltransferasen (HATs) acetyliert und war nach Histonen das erste Protein von dem bekannt wurde, dass es über De-/Acetylierung reguliert wird (Gu und Röder, 1997). Durch Deacetylierung wird die Aktivität von p53 gesenkt. Von den HDACs 1, 2 und 3, sowie von SIRT1 ist bekannt, dass sie p53 deacetylieren können (Choi *et al.*, 2015; Juan *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2014; Lee und Gu, 2013; Luo *et al.*, 2004). Ein spezifischer Inhibitor für HDAC 1, 2 und 3 ist MS-275 (Hess-Stumpp *et al.*, 2007). In Sonnemann und Marx *et al.* (2014) wurde bereits gezeigt, dass Entinostat p53-abhängig die Apoptose-Rate in HCT116 Zellen steigert, wohingegen HDACi mit einem breiteren Wirkspektrum p53-unabhängige Effekte auslösten. Die Kombination aus MS-275 mit CPT-11 sollte daher die Acetylierung von p53 und p53-abhängige Effekte verstärken. Mittels Durchflusszytometrie wurde (Abb. 5.1) gezeigt, dass nach 48 h Behandlung die Kombination aus Irinotecan und Entinostat zu einem signifikanten und synergistischen Anstieg der mitochondrialen Depolarisation ($\Delta\Psi_M$ Verlust), bzw. des Zelltodes in HCT116 p53wt Zellen führte. In HCT116 p53^{-/-} Zellen zeigte die Kombination schwächere Effekte. Die Apoptose schien also von p53 abhängig zu

sein. Außerdem schienen die post-translationalen Modifikationen von p53 dessen Funktion zu verstärken. Kürzere Behandlungszeiten führten noch nicht zum Verlust des $\Delta\Psi_M$ oder zum Zelltod. Der genotoxische Stress musste daher andauernd sein um Apoptose zu initiieren. Zhang *et al.* (2011) zeigten, dass p53 nach kurzfristigem DNA-Schaden an den Serinen 15 und 20 phosphoryliert und DNA-Reparaturprozesse aktiviert wurden. Infolge von DNA-Schäden wird p53 durch ATM erst phosphoryliert, nach andauerndem Stress weiter modifiziert und infolgedessen Apoptose ausgelöst (Saito *et al.*, 2002; Siciliano *et al.*, 1997; Banin *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 2000). Ähnliches könnte hier der Fall gewesen sein.

Durch Western Blot wurde (Abb. 5.2 und Anhang Abb. A.3) gezeigt, dass in HCT116 p53wt Zellen CPT-11 alleine die p53-Proteinmenge stark erhöhte und p53 an den C-terminalen Lysinen 382 und 373 acetyliert wurde. Die Kombination aus CPT-11 und MS-275 steigerte die p53-Proteinmenge nicht so stark wie die Einzelbehandlung mit CPT-11, jedoch waren die Acetylierung der beiden Lysine in p53 deutlich höher. Dies wurde durch Densitometrie der Western Blots bestätigt (Abb. 5.2 B).

In Zusammenhang damit wurde in HCT116 p53wt Zellen eine gesteigerte Spaltung von PARP1 und Caspase 3 nach kombinierter Behandlung aus CPT-11 und MS-275 detektiert (Abb. 5.2 A). Dies zeigte, dass der intrinsische Apoptose-Weg bereits nach 24 h initiiert wurde und die Effektor-Caspase 3 aktiv vorlag. Die höhere Menge an gespaltenem PARP1 (Abb. 5.2 A) war vermutlich die direkte Folge der Caspasen-Aktivierung und des DNA-Schadens selbst (Nagata, 2000; Kim *et al.*, 2005; Enari *et al.*, 1998). In HCT116 p53^{-/-} Zellen war dies nicht zu beobachten. Die geringeren Mengen an gespaltenem PARP1 und Caspase 3 könnten ein Grund für die niedrigere Apoptose in den p53-negativen Zellen gewesen sein. Durch den Einsatz des Caspase-Inhibitors zVAD (Chipuk und Green, 2005) wurde darüber hinaus gezeigt, dass der p53-abhängige $\Delta\Psi_M$ Verlust und der Zelltod nach kombinierter Behandlung mit CPT-11 und MS-275 auf das Niveau der HCT116 p53^{-/-} Zellen gemindert werden konnte (Abb. 5.3). Zusammen belegten diese Versuche, dass in den p53wt Zellen der Caspase-abhängige intrinsische Apoptose-Weg nach kombinierter Behandlung mit CPT-11 und MS-275 aktiv war und für die hohen Apoptose-Raten mit verantwortlich war.

Die Mengen an phosphoryliertem H2AX, einem Zeichen für DNA-Schäden (Willers *et al.*, 2015; Redon *et al.*, 2012), waren in beiden HCT116 Zelllinien durch die kombinierte Behandlung aus CPT-11 und MS-275 im Vergleich zur CPT-11-

Einzelbehandlung gesteigert (Anhang Abb. A.3). Dies zeigte, dass HCT116 p53wt und p53-/- Zellen dem gleichen genotoxischem Stress ausgesetzt waren und das MS-275 den DNA-Schaden verstärkte. Eine Erklärung dafür war, dass MS-275 wie andere HDACi die Acetylierung der Histone steigerte und damit zu Veränderungen der Chromatinstruktur führte (Lakshmaiah *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HDACi die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden verändern und Zellen sensibilisieren (Juan *et al.* 2000). Da allerdings nur die HCT116 p53wt Zellen signifikant mehr Apoptose durch die Kombination aus MS-275 und CPT-11 zeigten, schien der DNA-Schaden alleine nicht hauptverantwortlich zu sein, sondern p53. DNA-Schäden führen jedoch dazu, dass p53 über ATM aktiviert wird (Zhang *et al.*, 2009).

Eine weitere Beobachtung in den HCT116 p53wt Zellen war, dass die p21-Proteinmenge durch Irinotecan stark , in Kombination mit MS-275 jedoch nur gering gesteigert wurde (Abb. 5.3). Die p53-negativen Zellen hatten generell nur geringe p21-Mengen, die im Western Blot kaum detektierbar waren und daher für die DNA-Schadensantwort wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielten.

P21 ist sehr wichtig für die DNA-Schadensantwort, den Zellzyklusarrest und Reparaturprozesse und wird transkriptionell von p53 reguliert (Bunz *et al.*, 1998; Waldmann *et al.*, 1995). Stärke und Dauer eines DNA-Schadens bestimmen wie lange und stark p53 induziert wird und welcher Signalweg aktiviert wird. Es wurde gezeigt (Carvajal und Manfredi, 2013; Chen *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2009; Gottlieb und Vousden, 2010), dass p53 bei geringen Schäden p21 aktiviert und Reparaturprozesse initiiert. Starke und andauernde Schäden hingegen induzieren Apoptose. Die Menge an aktiviertem p53 und seine post-translationalen Modifikationen sind ausschlaggebend welche Art der DNA-Schadensantwort eingeleitet wird (Zhang *et al.*, 2011; Brooks und Gu, 2011 b). Für die vorliegende Arbeit lag daher nahe, dass durch die CPT-11-Einzelbehandlung, p21 in den HCT116 p53wt Zellen aktiviert wurde und vermutlich Reparaturprozesse gestartet wurden. Die Kombination aus CPT-11 und MS-275 führte zu stärkeren Schäden und einer geringeren p21-Expression, einhergehend mit einer gesteigerten C-terminalen Acetylierung von p53. Dies könnte mit dazu geführt haben, dass die Zellen infolgedessen weniger Reparaturprozesse starteten, jedoch durch aktiviertes p53 den intrinsischen Apoptose-Weg initiierten. Der zuvor beschriebene, stärkere DNA-Schaden durch die kombinierte Behandlung im Vergleich zur CPT-11-

Einzelbehandlung, konnte daher auch durch die geringere DNA-Reparatur zustande gekommen sein und hatte wahrscheinlich Anteil an der stärkeren Apoptose-Induktion über p53.

P53 hat transkriptionelle und nicht-transkriptionelle Funktionen nach zellulärem Stress (Chen *et al.*, 1996; Vousden und Prives, 2009; Laptenko *et al.*, 2015). Um die transkriptionelle Funktion von p53 nach den Behandlungen mit CPT-11 alleine und in Kombination mit MS-275 zu untersuchen, wurden die mRNA-Expressionen beider HCT116 Zelllinien analysiert. Dabei zeigte sich, dass CPT-11 in HCT116 p53wt Zellen die Expression von p53-Zielgenen steigerte. MS-275 alleine und die Kombination aus MS-275 und CPT-11 reduzierten die mRNA-Expression dieser Gene dagegen deutlich, im Fall von *CDKN1A* (p21), *MDM2* und *BAX* sogar unter den Ausgangswert (Abb. 5.4). Die gesteigerte mitochondriale Apoptose nach Behandlung mit MS-275 und CPT-11 lag daher weitestgehend nicht an einer gesteigerten Genexpression von pro-apoptischen Proteinen wie BAX oder PUMA, sondern beruhten vermutlich auf den nicht-transkriptionellen Funktionen von p53. MS-275 schien die transkriptionelle Aktivität von p53 zu senken und damit die mRNA-Expression und Proteinmengen seiner Zielgene zu reduzieren. Die geringeren Mengen an *MDM2* nach der kombinierten Behandlung könnten die p53-Proteinstabilität gesteigert haben. Das Protein MDM2 ist für den proteasomalen Abbau von p53 und die Regulation der zytosolischen Proteinmengen verantwortlich. Damit steuert MDM2 auch die Dauer und das Ausmaß von p53-vermittelten Signalwegen, wird jedoch selbst von p53 transkriptionell reguliert. (Kubbutat *et al.*, 1997; Marchenko *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011; Unger *et al.*, 1999). Die mRNA-Expression der p53-Zielgene wurde in den HCT116 p53^{-/-} Zellen durch die verschiedenen Behandlungen kaum beeinflusst. Die Expressionen von *BAX*, *MDM2* und *BBC3* (PUMA) wurden durch alle Behandlungen reduziert. *CDKN1A* wurde hingegen durch den Einsatz von MS-275 gesteigert. Für *CDKN1A* sind p53-unabhängige Regulationswege beschrieben die dessen Expression in den p53-negativen Zellen erklärten (Macleod *et al.*, 1995; Aliouat-Denis *et al.*, 2005). Allerdings wurde zuvor durch Western Blot gezeigt (Abb. 5.2), dass die resultierenden p21-Proteinmenge in den HCT116 p53^{-/-} Zellen immer noch deutlich geringer waren als in den p53wt Zellen und der Beitrag zur DNA-Schadensantwort wahrscheinlich gering war.

Die p53-abhängige Apoptose-Induktion sollte daher auf einer Protein-Protein-Interaktion beruhen. P53 leitet den intrinsischen Apoptose-Weg ein, indem es mit Proteinen der BCL-2-Familie an der äußeren mitochondrialen Membran interagiert (Kroemer *et al.*, 2007). Die Interaktion an den Mitochondrien ist unabhängig von der transkriptionellen Aktivität von p53 und führt zur Permeabilisierung der äußeren Membran (Chipuk *et al.*, 2004; Marchenko *et al.*, 2007). Dies wurde durch weitere Experimente untersucht.

Durch zelluläre Fraktionierungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass p53 nach genotoxischem Stress an Mitochondrien lokalisiert war (Abb. 5.5 A). Wie zuvor beobachtet (Abb. 5.2), induzierte Irinotecan die p53 Menge und Acetylierung an den Mitochondrien. Die Kombination mit MS-275 steigerte die C-terminale Acetylierung weiter. Dabei waren die Zunahmen im Zytosol und in den Mitochondrien vergleichbar. Das Verhältnis zwischen zytosolischem und mitochondrialem p53 schien trotz der verschiedenen Behandlungen erhalten zu bleiben. Anhand weiterer Fraktionierung der isolierten Mitochondrien wurde deutlich (Abb. 5.5 B), dass p53 nach der kombinierten Behandlung mit CPT-11 und MS-275 sowohl in der mitochondrialen Matrix, als auch an den mitochondrialen Membranen zu finden war. Darüber hinaus wurde auch acetyliertes p53 in beiden Teilen der Mitochondrien nach genotoxischem Stress gefunden. Von Marchenko *et al.* (2000) wurde gezeigt, dass die mitochondriale Lokalisation direkt mit dem Verlust von $\Delta\Psi_M$, der Freisetzung von Cytochrom c und Caspasen-Aktivierung einhergeht. Daher war zu vermuten, dass dies auch in dieser Arbeit der Fall war.

Es ist seit längerem bekannt, dass ein Teil des zytosolischen p53 nach Mono-Ubiquitinierung an und in Mitochondrien lokalisiert ist (Mihara *et al.*, 2003; Vaseva und Moll, 2013; Marchenko *et al.*, 2007; Brooks und Gu, 2011 a). Die Acetylierung scheint für die Lokalisation keine bedeutende Rolle zu spielen (Nemajero *et al.*, 2005), jedoch ist die anschließende Interaktion von p53 mit mitochondrialen Proteinen von dessen Acetylierungsstatus abhängig (Liu *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012). Für die Funktion von p53 in der mitochondrialen Matrix ist bisher die Interaktion mit Nf- κ B und damit verbunden, die Regulation des mitochondrialen Metabolismus bekannt (Johnson *et al.*, 2011; Johnson and Perkins, 2012). Außerdem interagiert p53 mit der mitochondrialen DNA Polymerase γ (mtDNA Pol c) und schützt Zellen dadurch vor Mutationen und Schäden der mtDNA (Achanta *et al.*, 2005). An der mitochondrialen Matrix interagiert p53 mit den pro- und anti-

apoptotischen Proteinen der BCL-2-Familie. Diese Interaktionen von p53 an der mitochondrialen Membran führen schließlich zur Oligomerisierung von BAX und BAK und damit zu MOMP (Jiang *et al.*, 2006; Marchenko *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2010; Green und Kroemer, 2004; Vander Heiden *et al.*, 1997; Hemann und Lowe, 2006). Durch MOMP werden Proteine des Intermembranraums in das Zytosol freigesetzt und initiieren dort den Caspase-abhängigen intrinsischen Apoptose-Weg (Kroemer *et al.*, 2007; Mihara *et al.*, 2003; Leu *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2010; Green und Kroemer, 2004).

In den Experimenten dieser Arbeit (Abb. 5.5) aktivierte die Behandlung mit Irinotecan p53 und bewirkte, dass ein Teil davon an die Mitochondrien der HCT116 p53wt Zellen lokalisierte. Durch die Kombination mit MS-275 wurde die Acetylierung von p53 verstärkt und dessen transkriptionelle Aktivität verringert. Die gesteigerte Apoptose beruhte daher wahrscheinlich auf der nicht-transkriptionellen direkten Protein-Protein-Interaktion von p53 an den Mitochondrien. Durch die kombinierte Behandlung mit CPT-11 und MS-275 kam es in den HCT116 p53wt Zellen vermutlich zu einer verstärkten Interaktion von p53 mit Proteinen der BCL-2-Familie und dadurch zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Die Messungen des $\Delta\Psi_M$ Verlustes (Abb. 5.1) und die beobachtete Aktivierung der Caspase 3 (Abb. 5.2) unterstützten diese Annahme.

Ähnliche Befunde wurden zuvor von anderen Arbeitsgruppen gemacht. Dos Santos *et al.* (2012) zeigten dass der HDACi Natriumbutyrat die Apoptose-Induktion durch Etoposid und Cisplatin steigern konnte. Dabei wurden gesteigerte BIM-Proteinmengen und eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9 gemessen. Solomon *et al.* (2006) zeigten, dass der HDACi Trichostatin A (TSA) in Kombination mit dem Sirtuin-Inhibitor (SIRTi) EX-527 die p53-abhängige Apoptose nach DNA-Schäden verstärkte. Catalano *et al.* (2006) nutzten den HDACi Valproinsäure (VPA) um den toxischen Effekt von Doxorubicin zu verstärken. Die Caspase-abhängige Apoptose wurde dabei allerdings als Folge der erhöhten Histon-Acetylierung und der Chromatinveränderung betrachtet. Krämer *et al.* (2008) zeigten, dass VPA in Kombination mit Hydroxyurea (HU) die Expression von p21 deutlich senkte und damit den Caspase-abhängigen Apoptose-Weg steigerte. Dabei sind die beiden HDACi TSA und Vorinostat alleine in der Lage die Caspasen 3 und 9 zu aktivieren und den intrinsischen Apoptose-Weg zu starten (Henderson *et al.*, 2003). Die

Kombination aus DNA-schädigender Chemotherapie und einem HDACi ist daher ein wirkungsvoller Ansatz um Tumore mit wildtypischem p53 zu behandeln.

Die vorliegende Arbeit konnte darüber hinaus zeigen, dass die Kombination aus Irinotecan und Entinostat besonders die Acetylierung der C-terminalen Region in p53 verstärkte und damit die mitochondriale Apoptose beeinflusste. Durch Western Blot (Abb. 5.9 und Abb. 5.2) und Massenspektroskopie (Abb. 5.10) wurde deutlich, dass p53 infolge des CPT-11-induzierten DNA-Schadens an mehreren Lysinen der DNA-Bindedomäne (K292), der Tetramerisierungsdomäne (K305, K319, K320, K321) und der C-terminalen Domäne (K373, K381, K382) stark acetyliert wurde. Die Kombination aus CPT-11 und MS-275 steigerte jedoch spezifisch die Acetylierung der C-terminalen Lysine 373, 381 und 382. Der Acetylierungsgrad der übrigen untersuchten Lysine blieb durch den HDACi unbeeinflusst und schien rein vom DNA-Schaden abhängig zu sein. Der Acetylierungsstatus schien daher in Zusammenhang mit der verstärkten p53-abhängigen Apoptose nach Behandlung mit CPT-11 in Kombination mit MS-275.

Die Rolle der C-terminalen Acetylierung von p53 wurde mittels Durchflusszytometrie weitergehend untersucht (Abb. 5.11). Dazu wurde der $\Delta\Psi_M$ Verlust und der Zelltod einer C-terminalen p53-Mutante (p53 6KR) nach Behandlung mit CPT-11 und MS-275 im Vergleich zu HCT116 p53wt Zellen bestimmt. Alle sechs C-terminalen Lysine dieser p53-Mutante waren durch Arginine ersetzt worden. Die Versuche zeigten eindeutig, dass die p53-Mutante nicht mehr in der Lage war das mitochondriale Membranpotential zu reduzieren oder den Zelltod zu steigern. Vielmehr verhielten sich die stabil mit p53 6KR rekonstituierten HCT116 Zellen wie p53 negative Zellen, bzw. die mit GFP stabil transfizierten HCT116 Zellen. Dies konnte zum Teil an den niedrigeren basalen p53-Proteinmengen der p53 6KR-Mutante im Vergleich zu den p53-Wildtyp-Zellen liegen. Allerdings konnte p53 6KR, ähnlich wie wildtypisches p53, durch die Behandlung mit CPT-11 und MS-275 aktiviert werden und dessen Proteinmenge gesteigert werden (Anhang Abb. A.5). Die HCT116 Zellen mit p53 6KR hätten daher auch eine gesteigerte Apoptose nach genotoxischem Stress zeigen müssen, sofern die p53-Mutante in der Lage gewesen wäre, den intrinsischen Apoptose-Weg auszulösen. Somit deuteten diese Versuche darauf hin, dass die Acetylierung des C-Terminus von p53 eine entscheidende Rolle für die Apoptose spielte.

Bisher wurde beschrieben, dass besonders die Acetylierung der Lysine 120 und 164 im Bereich der DNA-Bindedomäne von p53 für die direkte Interaktion mit BCL-2-Familie Proteinen und die Initiation des intrinsischen Apoptose-Wegs sowie eines Zellzyklusarrestes verantwortlich sind. K120 wird von TIP60, bzw. hMOF acetyliert und von HDAC1 deacetyliert (Mellert *et al.*, 2011; Sykes *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2006). TIP60 selbst unterliegt dabei einer Regulation durch HDAC3 (Yi *et al.*, 2014). Der HDACi MS-275 sollte den Acetylierungsgrad des Lysin 120 und damit die zelluläre Apoptose-Rate steigern können (Mellert *et al.*, 2011). Im Mausmodell ist gezeigt worden, dass die Mutation von K120 zum Verlust der Apoptose-Induktion durch p53 führt. Durch die zusätzliche Mutation von K164 verlor p53 darüber hinaus seine transkriptionelle Funktion (Li *et al.*, 2012). Sykes *et al.* (2006) zeigten mit humanem p53, dass durch die Mutation von K120 bereits ein Teil der transkriptionellen Aktivität verloren ging. Diese p53-Mutante konnte nicht mehr die pro-apoptotischen Proteine BAX und PUMA aktivieren, war jedoch weiterhin in der Lage p21 und MDM2 zu regulieren. Die Acetylierung von K120 steigert außerdem die DNA-Bindung von p53 (Arbely *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte weder mittels Western Blot, noch durch Massenspektroskopie die Acetylierung des Lysin 120 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Obwohl durch die Massenspektroskopie die post-translationale Modifikation von p53 sehr präzise untersucht wurde, ist nicht vollständig ausgeschlossen, dass p53 nach der Behandlung mit MS-275 an K120 acetyliert wurde und dies einen Beitrag zur Apoptose-Induktion leistete. Allerdings führte die MS-275-Einzelbehandlung nur zu einer geringfügigen Steigerung der Apoptose und der Senkung der transkriptionellen Aktivität von p53 (Abb. 5.1). Daher schien die Menge an acetyliertem K120 entweder so gering zu sein, dass sie nicht detektierbar oder die Rolle dieser Modifikation für die Art der Behandlung von geringer Bedeutung war.

Für das Lysin 320 in p53 wurde gezeigt, dass dessen Acetylierung in Zusammenhang mit verminderter N-terminaler Phosphorylierung, gesteigerten Reparaturprozessen und p21-Aktivierung nach DNA-Schäden steht (Chao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Knights *et al.*, 2006). Hingegen führt die Acetylierung von K373 zu einer gesteigerten N-terminalen Phosphorylierung, transkriptionellen Aktivierung von pro-apoptotischen p53-Zielgenen und gesteigerter Apoptose (Zhang *et al.*, 2006; Knights *et al.*, 2006). Eine verstärkte Acetylierung von K382 steigert die Apoptose-Rate in Tumorzellen (D'Orazi *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Smeek

und Lohrum, 2010). In dieser Dissertation zeigte sich, dass p53 durch die Behandlung mit CPT-11 an den beiden Lysinen acetyliert wurde (Abb. 5.2 und Abb. 5.10). Dabei war der Acetylierungs-Grad von K320 hauptsächlich von der CPT-11-Behandlung abhängig (Abb. 5.10). Die Acetylierung von K373 konnte hingegen durch die Kombination aus CPT-11 und MS-275 weiter gesteigert werden (Abb. 5.2). Das bedeutete, p53 wurde durch CPT-11 alleine bereits aktiviert und folglich post-translational modifiziert. Durch die Kombination mit MS-275 wurde die C-terminale Acetylierung von p53 stark erhöht. Nach dieser Behandlung schien durch das veränderte post-translationalen Modifikationsmuster von p53 der intrinsische Apoptose-Weg gestartet zu werden und die Expression von p53 Zielgenen gesenkt zu werden. Dabei spielte wahrscheinlich auch die Dauer des Schadens eine Rolle, denn erst nach 48 h Behandlungszeit traten signifikante Unterschiede zwischen den beiden HCT116 Zelllinien und den jeweiligen Behandlungen auf (Abb. 5.1).

Die Acetylierung des C-Terminus von p53 verringert die Bindung an MDM2, verhindert dessen proteasomalen Abbau und erhöht damit die zytosolische p53-Proteinmenge (Li *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2008). MDM2 wiederum kann die C-terminale Acetylierung von p53 durch CBP/p300 aktiv verhindern (Ito *et al.*, 2001). Die Acetylierung des p53 C-Terminus steigert dessen spezifische DNA- und Promotorbindung und führt zu einer Aktivierung, unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus (Liu *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008). Zur weiteren Funktion des p53 C-Terminus gibt es in der Literatur teils widersprüchliche Befunde, wobei Brooks *et al.* (2011 b) dies beispielsweise auf Unterschiede in den verwendeten Zelllinien zurückführen.

Die C-terminale Domäne wurde lange nur in Zusammenhang mit der Aktivierung und Stabilität von p53 betrachtet. Krummel *et al.* (2005) zeigten im Mausmodell, dass eine p53 7KR-Mutante (analog zum humanen p53 6KR) sich wie wildtypisches p53 verhielt. Das zytosolische Protein hatte ähnliche Halbwertszeiten und Funktionen im Zellzyklus und bei der Apoptose-Induktion. Darüber hinaus wurde die p53-Mutante schneller durch DNA-Schäden aktiviert als der Wildtyp. Diese Arbeitsgruppe sah die Funktionsweise des C-Terminus daher nur in der Feinabstimmung der p53-Signalwege. Feng *et al.* (2005) zeigten, dass der C-terminale Bereich durch multiple post-translationalen Modifikationen verändert werden kann. In humanen Zellen wurde in dieser Arbeit erneut gezeigt, dass p53 6KR normal exprimiert wurde und eine zum Wildtyp unveränderte Proteinstabilität hatte. Allerdings war in dieser Studie die

transkriptionelle Aktivität von p53 6KR geringer als im Wildtyp. Durch Rodriguez *et al.* (2000) wurde wiederum gezeigt, dass die p53 6KR-Mutante transkriptionell aktiv blieb und sich durch die Mutation nur die Proteinstabilität erhöhte, da der MDM2-abhängige Abbau von p53 geringer war. Tang *et al.* (2008) verwendeten eine p53 8KR Mutante. Bei dieser Mutante waren, neben den sechs C-terminalen Lysinen, auch die beiden Lysine 120 und 164 im Bereich der DNA-Bindedomäne durch Arginine ersetzt. Dadurch wurden andere Modifikationen wie die Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinflusst. P53 8KR verlor allerdings vollständig seine Funktion im Zellzyklus und bei der Apoptose-Induktion. Es war aber weiterhin in der Lage MDM2 transkriptionell zu aktivieren und an Promotoren zu binden. Hingegen konnte diese p53-Mutante nicht mehr die pro-apoptotischen Proteine BAX, PUMA und PIG-3 aktivieren und damit nicht den intrinsischen Apoptose-Weg starten. Die Transkription von p21 fand ebenfalls nicht mehr statt. Die Acetylierung dieser acht Lysine in p53 schien daher für dessen Funktion in der mitochondrialen Apoptose und im Zellzyklusarrest essenziell zu sein. Durch Liptenko *et al.* (2015) wurde anhand verschiedener p53-Mutanten (6KR; 6KQ, Lysin-zu-Glutamin-Mutante; 8KR) erst kürzlich gezeigt, dass die Acetylierung des C-Terminus von p53 die spezifische DNA-Bindung verstärkte. Diese Bindung war davon abhängig wie weit die jeweilige Bindestelle von der p53 Konsensussequenz abwich. Darüber hinaus ermöglichte der C-Terminus die Bildung stabiler Komplexe aus DNA und p53 indem Konformationsänderungen der DNA-Bindedomäne ausgelöst wurden. Abschließend konnten sie die Funktion des C-Terminus jedoch nicht vollständig klären.

Die vorliegende Arbeit versuchte einen weiteren Beitrag dazu zu leisten. Anhand der p53 6KR-Mutante wurde gezeigt, dass die C-terminale Acetylierung entscheidend für die mitochondriale Apoptose war. Dies wurde bisher in der Literatur so nicht beschrieben. Der Verlust an $\Delta\Psi_M$ und der Zelltod waren in Zellen mit p53 6KR deutlich geringer als in Zellen mit wildtypischem p53 und die synergistische Zunahme der Apoptose durch die kombinierte Behandlung aus CPT-11 und MS-275 fand nicht mehr statt (Abb. 5.11). Dabei war p53 6KR ähnlich zum Wildtyp weiterhin an Mitochondrien lokalisiert und konnte durch genotoxischen Stress induziert werden (Anhang Abb. A.5). Wie zuvor erwähnt, wurde gezeigt, dass die mitochondriale Lokalisation von p53 direkt mit MOMP einhergeht (Marchenko *et al.*, 2000). Da MOMP, bzw. der Verlust von $\Delta\Psi_M$, durch die p53 6KR-Mutante nicht mehr ausgelöst wurde, schienen die C-terminalen Lysine und wahrscheinlich deren Acetylierung

dafür verantwortlich zu sein. Da die mRNA-Expression der p53 6KR-Mutante im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, bleibt offen, ob diese eine Rolle für die geringere Apoptose spielte. Da allerdings für wildtypisches p53 bereits gezeigt wurde, dass die transkriptionelle Regulation durch MS-275 gesenkt wird und keinen Beitrag zur gesteigerten Apoptose bringt, konnte davon ausgegangen werden, dass dies auch für p53 6KR wenig Bedeutung hatte. Vielmehr schien die Interaktion von p53 an Mitochondrien ausschlaggebend.

6.2 Irinotecan löste reaktive Sauerstoffspezies und mitochondriale Schäden aus

Neben der p53-abhängigen Apoptose wurden durch die Behandlung mit Irinotecan die Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) gesteigert (Abb. 5.6). ROS entstehen hauptsächlich in den beiden Atmungskettenkomplexen I und III, aber auch durch die Reaktionen der α -Ketoglutarat-DH, Pyruvat-DH und NADPH-Oxidase und treten häufig als Folge von DNA-Schäden oder Änderungen des Metabolismus auf (Sheu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2001; Murphy 2009; Tsang *et al.*, 2003; Hagenbuchner *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014; Ewald *et al.*, 2010; Goehle *et al.*, 2012;). Erhöhte ROS-Mengen erzeugen wiederum weitere Schäden an der DNA, an Proteinen und an Lipiden und stehen damit auch in Zusammenhang mit Alterungsprozessen (Martindale und Holbrook, 2002). Sie senken einerseits die Expression von BCL-2, steigern dafür andererseits die Expression von BAX und BIM und aktivieren p53 über ATM (Hagenbuchner *et al.*, 2012; Hildeman *et al.*, 2003; Tsang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Martindale und Holbrook, 2002). In beiden HCT116 Zelllinien nahmen die ROS-Mengen alleine durch die CPT-11-Behandlung und den resultierenden DNA-Schaden zu. Der HDACi MS-275 alleine, aber auch in Kombination mit CPT-11, hatte darauf kaum einen Einfluss, obwohl beschrieben wurde, dass MS-275 ROS in Tumorzellen induziert und damit den Caspase-abhängigen intrinsischen Apoptose-Weg startet (Rosato *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2004). Allerdings waren Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu beobachten. Die HCT116 p53wt Zellen hatten deutlich weniger ROS als die p53-negativen Zellen, trotz des vergleichbaren DNA-Schadens (Abb. 5.6). P53 kann aktiv die Menge an ROS reduzieren und damit den Redoxstatus der Zelle regulieren indem es ROS-scavenger-Proteine aktiviert (Gottlieb und Vousden, 2010; Maddocks und Vousden, 2011). Dazu zählen die Glutathion-Peroxidase, Mn-

Superoxid-Dismutase, Aldehyd-Dehydrogenase 4 und Sestrine (Sablina *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004; Budanov *et al.*, 2004). Diese Funktion von p53 sorgte wahrscheinlich dafür, dass die ROS infolge des DNA-Schadens gesenkt wurden. Durch die Behandlung mit CPT-11 wurden also auch p53-Signalwege aktiviert, die das Genom vor weiteren Schäden schützten (Sablina *et al.*, 2005).

Mittels Western Blots konnte gezeigt werden, dass die BIM-Proteinmenge durch die Behandlungen vor Allem in den HCT116 p53^{-/-} Zellen gesteigert wurde (Anhang Abb. A.4). BIM zählt zu den pro-apoptotischen BCL-2-Familie Proteinen und ist genauso wie BID und p53 in der Lage BAX und BAK zu oligomerisieren (Letai *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2009). BIM hat weitere, zu p53 ähnliche, Funktionen und kann mit p53 zusammenwirken um Apoptose auszulösen, ist aber nicht auf p53 angewiesen und wird nicht von diesem reguliert (Shang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2010). BIM wird unter Anderem durch erhöhte ROS-Mengen über FOXO3A aktiviert (Hagenbuchner *et al.*, 2012). Der intrinsische Apoptose-Weg ist in p53-negativen Zellen sehr stark abhängig von BIM. Ein Verlust von BIM kann daher, besonders in diesen Zellen, zu Chemoresistenzen führen (Shang *et al.*, 2012; Akiyama *et al.*, 2009). Die höheren BIM-Proteinmengen und ROS könnten also eine Erklärung für die beobachteten Apoptose-Raten in den HCT116 p53^{-/-} Zellen nach Behandlung mit CPT-11 alleine und in Kombination mit MS-275 sein (Abb. 5.1). Stauber *et al.* (2012) konnten zeigen, dass BIM für die Apoptose-Induktion in *head and neck squamous cell carcinomas* (HNSCCs) verantwortlich ist. Dabei waren die durch HU und VPA ausgelösten Effekte unabhängig von wildtypischem p53. Tsang *et al.* (2003) zeigten, dass ROS nach Doxorubicin-Behandlung für die Apoptose-Induktion in p53-negativen Zellen verantwortlich waren. Insgesamt trugen die erhöhten ROS und BIM-Proteinmengen wahrscheinlich zur Apoptose in beiden HCT116 Zelllinien bei, waren für die Apoptose-Induktion in den HCT116 p53^{wt} Zellen jedoch nicht ausschlaggebend. Für die HCT116 p53^{-/-} Zellen könnten BIM und die gesteigerten ROS jedoch eine bedeutende Rolle gespielt haben. Die hohe BIM-Proteinexpression nach MS-275-Einzelbehandlung (Anhang Abb. A.4) konnten nicht durch ROS erklärt werden und beruhten wahrscheinlich auf einem anderen Mechanismus, der im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet wurde.

Als Folge der gesteigerten ROS und der intrinsischen Apoptose kam es in den HCT116 Zellen zu mitochondrialen Schäden. In beiden Zelllinien wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie Anzeichen mitochondrialem Abbaus, bzw.

Autophagie, so genannter Mitophagie, beobachtet (Abb. 5.7). Mitochondrien sind zum einen die Hauptquelle, aber auch ein direktes Ziel von ROS. Geschädigte Mitochondrien werden durch Mitophagie abgebaut und nur funktionelle Mitochondrien bleiben in den Zellen erhalten. Mitophagie ist daher eine Art Schutzprozess und kann auch in Abwesenheit von p53 stattfinden (Tasdemir *et al.*, 2008; Mammucari und Rizzuto, 2010; Munoz-Gamez *et al.*, 2009; Gewirtz, 2013). Der mitochondriale Abbau war in den HCT116 p53wt Zellen stärker als in den p53-negativen Zellen (Abb. 5.7). Abgebaute Mitochondrien tragen nicht mehr zum $\Delta\Psi_M$ der Zelle bei (Kim *et al.*, 2007). Dass könnte eine Erklärung dafür gewesen sein, dass der Verlust von $\Delta\Psi_M$ nach 24 h noch relativ gering war, obwohl bereits deutliche mitochondriale Schäden, deren Abbau und die Initiation der intrinsischen Apoptose beobachtet wurde.

Zusätzlich könnte durch die CPT-11-Behandlung und die damit verbundenen mitochondrialen Schäden und $\Delta\Psi_M$ Verlust, die oxidative Phosphorylierung kurzzeitig entkoppelt worden sein (Desquiret *et al.*, 2006). Aktiviertes BAX und PUMA können die OXPHOS entkoppeln. P53 hätte dies durch die Interaktion mit den beiden Proteinen auslösen können (Liu *et al.*, 2008; Sablina *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). In den HCT116 p53-/- Zellen könnten die vergleichsweise höheren ROS-Mengen und BIM mitochondriale Schäden und die Oligomerisierung von BAX erzeugt haben.

Die Entkopplung der Atmungskette beruht dabei darauf, dass Protonen ungehindert den IMS verlassen können und das mitochondriale Membranpotential damit reduziert wird. Dieser Prozess wurde bisher allerdings nur für Substanzen wie beispielsweise 2,4-Dinitrophenol (DNP), und Carbonylzyanid-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) und mitochondriale *uncoupling proteins* (UCPs) beschrieben (Wallace und Starkov, 2000; Loiseau *et al.*, 2009; Baffy *et al.*, 2011; Desquiret *et al.*, 2006). Im dem hier beschriebenen Fall hätte eine Entkopplung zur Folge gehabt, dass die Aktivität der Atmungskette stark gesteigert würde, um Protonen durch die innere mitochondriale Membran zu pumpen und damit das mitochondriale Membranpotential, trotz der Schäden, aufrecht zu erhalten. Dies würde nach 24 h Behandlungszeit einerseits den durch CPT-11 gesteigerten Metabolismus parallel zu den beobachteten mitochondrialen Schäden und der beginnenden intrinsischen Apoptose erklären. Andererseits würde sich auch damit erklären lassen, warum der Verlust von $\Delta\Psi_M$ nach 24 h dennoch relativ gering ist. Nach 48 h waren die Schäden in den HCT116 p53wt Zellen nach kombinierter Behandlung mit CPT-11 und MS-275

dann aber wahrscheinlich so immens, dass diese Zellen ihr $\Delta\Psi_M$ verloren und in die Apoptose übergingen. Da bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs nur intakte und vitale, adhärente Zellen berücksichtigt wurden, zeigten die HCT116 p53wt Zellen selbst nach 48 h Behandlung mit CPT-11 und MS-275 eine deutlich gesteigerte Respiration. Bei der Messung des $\Delta\Psi_M$ Verlusts und des Zelltodes, sowie den Western Blot Experimenten wurden hingegen alle Zellen mit berücksichtigt um das volle Ausmaß der Apoptose zu erfassen. Unter diesen Versuchsbedingungen wäre die zelluläre Respiration nach 48 h Behandlungszeit vermutlich geringer ausgefallen.

Anschließend wurde das Ausmaß der gesamten Autophagie nach genotoxischem Stress mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 5.8). Der Prozess der Autophagie wird häufig als anti-apoptotisch betrachtet, da er defekte Proteine und Organellen entfernt und Zellen somit vor längerfristigen Schäden schützt. Allerdings steht aktuell noch zur Debatte, ob die Autophagie ausschließlich schützend oder auch schädlich für die Zellen ist (Kubli und Gustafsson, 2012; Munoz-Gamez *et al.*, 2009; Mammucari and Rizzuto, 2010; Gewirtz, 2013). Bereits nach 24 h stieg durch die Behandlung mit CPT-11 alleine und in Kombination mit MS-275 in beiden HCT116 Zelllinien die Autophagie leicht an. Nach 48 h Behandlung mit CPT-11 alleine wurde die Menge der Autophagie in HCT116 p53wt Zellen sehr stark induziert (Abb. 5.8). Dieser Effekt wurde durch die Kombination aus CPT-11 und MS-275 fast vollständig reduziert. Parallel dazu wurde beobachtet, dass die CPT-11-Einzelbehandlung relativ gering den intrinsischen Apoptose-Weg initiierte, die Kombination aus CPT-11 und MS-275 hingegen sehr stark (Abb. 5.1). Der Abbau geschädigter Mitochondrien könnte daher die Zellen vor defekten Mitochondrien und dem intrinsischen Apoptose-Weg geschützt haben. Durch geringere Autophagie könnten mitochondriale Schäden in den Zellen akkumulieren. Unterschiedliche post-translationale Modifikationen in p53 könnten dabei wieder eine Rolle gespielt haben, wie stark die Autophagie induziert wurde und wie gut damit die Zellen vor weiteren Schäden geschützt wurden. Für diese Unterschiede zwischen den Zelllinien war vermutlich die p53-abhängige Regulation der Autophagie verantwortlich (Goehe *et al.*, 2012; Gewirtz, 2013). In den p53-negativen Zellen wurde nach 48 h durch alle Behandlungen die Autophagie deutlich gesteigert, wahrscheinlich um geschädigte Proteine und Organellen aus den Zellen zu entfernen. Dadurch könnte die Autophagie die HCT116 p53-/- Zellen teilweise vor den Folgen der Behandlungen geschützt haben und damit die vergleichsweise geringe Apoptose in diesen Zellen mit erklären (Abb. 5.1).

6.3 DNA-Schäden lösen globale Änderungen des Zellstoffwechsels aus

Ein weiterer wichtiger Teil der Zellvitalität ist deren Stoffwechsel. Die verwendeten HCT116 Zellen haben, wie eine Vielzahl an Tumorzellen, einen glykolytischen Metabolismus (Donohoe *et al.*, 2012; Faubert *et al.*, 2013). Allerdings haben Tumorzellen, wie bereits zuvor erwähnt, ein relativ hohes Potential ihre oxidative Phosphorylierung zu steigern und ihre Energie über den Verbrauch von Sauerstoff zu generieren (Diaz-Ruiz *et al.*, 2011; Loiseau *et al.*, 2009; Desquirit *et al.*, 2006). Überraschenderweise wurde, trotz der für p53 beschriebenen Regulation des Zellstoffwechsels, durch Irinotecan in beiden HCT116 Zelllinien der Sauerstoffverbrauch und MTT-Umsatz pro Zellzahl gesteigert. P53 reguliert den Zellstoffwechsel an mehreren Stellen und steigert dabei die OXPHOS und senkt die Glykolyse-Rate. Dies führt zu einer Art Umkehr des Warburg Effektes (Matoba *et al.*, 2006; Okamura *et al.*, 1999; Schwartzberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2004; Kawauchi *et al.*, 2008; Bensaad *et al.*, 2006; Gottlieb und Vousden, 2010).

Der Umsatz des Farbstoffs MTT beruht auf der Menge an zytosolischem NADH und auf der Aktivität der Succinat-DH (Mosmann, 1983; Yamaue *et al.*, 1991; Berridge und Tan, 1993). Die Succinat-DH oder Komplex II, ist die Schnittstelle zweier Stoffwechselwege, dem Zitratzyklus und der Atmungskette. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs gab darüber hinaus Auskunft über die Aktivität des Atmungskettenkomplexes IV. Beide Methoden zeigten, dass bereits nach 24 h p53-unabhängig durch CPT-11 die Aktivität der Atmungskette signifikant gesteigert wurde (Abb. 5.12 und 5.13). Dieser Effekt trat noch nicht nach kurzen Behandlungszeiten auf, sondern eine gewisse Dauer war nötig um die Sauerstoffverbrauch zu steigern (Anhang Abb. A.6). Dafür blieb die gesteigerte Atmungskettenaktivität bis 48 h Behandlung erhalten. Der HDACi MS-275 hatte darauf keinen Einfluss. Nur der zugrundeliegende DNA-Schaden, durch die von CPT-11 erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche, schien dafür verantwortlich zu sein und eine Beteiligung von ATM-Signalwegen lag somit nahe. ATM spielt für Mitochondrien eine wichtige Rolle und kann sowohl die Produktion von ROS, die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung als auch die mitochondriale Morphologie und Autophagie regulieren (Valentin-Vega *et al.*, 2012). Um dies zu untersuchen wurden Zellen mit CPT-11 alleine und in Kombination mit dem ATM-Inhibitor KU55933 behandelt (Anhang Abb. A.7). KU55933 war tatsächlich in der Lage den durch CPT-11

verursachten Anstieg des MTT-Verbrauchs pro Zellzahl zu senken. Darüber hinaus konnte durch Versuche mit weiteren DNA-schädigenden Chemotherapeutika gezeigt werden, dass der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nicht auf die Behandlung mit CPT-11 beschränkt war und dieser auch in K562 Zellen stattfand (Abb. 5.16). Interessanterweise erhöhten HU und Doxorubicin den Sauerstoffverbrauch nicht so deutlich wie CPT-11, bzw. steigerten Oxaliplatin und 5-Fluoruracil den O₂-Verbrauch nahezu gar nicht.

All dies legte nahe, dass hauptsächlich der DNA-Schaden und die ausgelöste DNA-Schadensantwort den Stoffwechsel einer Zelle veränderte, das Ausmaß der Veränderung hing dabei aber scheinbar von der Substanz und deren Wirkungsweise ab. Da im Rahmen dieser Arbeit nicht von allen Substanzen Dosis-Wirkungskurven erstellt wurden, ist es jedoch nicht ausgeschlossen, dass andere Konzentrationen deutlichere Effekte zur Folge gehabt hätten.

Die Untersuchung mehrerer Stoffwechselzwischenprodukte durch Massenspektroskopie zeigte, dass neben der Aktivität der Atmungskette der gesamte intrazelluläre Metabolismus durch CPT-11 gesteigert wurde (Abb. 5.17 und Anhang Abb. A.8 bis A.10). Mehrere Stoffwechselwege schienen parallel aktiviert worden zu sein. Es wurden Anzeichen gesteigerter Glykolyse, Glutaminolyse und Zitratzyklusaktivität gefunden. Diese führten wiederum durch die Produktion von Reduktionsäquivalenten wie NADH oder FADH₂ (nicht untersucht) zur Steigerung der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette (Zhdanov *et al.*, 2014). Allerdings wurde parallel zur gesteigerten OXPHOS auch eine Steigerung der Laktatsekretion gemessen. Pyruvat wurde also nicht nur zu Acetyl-CoA umgesetzt und im Zitratzyklus verbraucht sondern es schien ein Teil davon auch fermentiert zu werden. In seneszenten Zellen führt die Aktivität der Pyruvat-DH dazu, dass Pyruvat fast ausschließlich zu Acetyl-CoA umgewandelt und damit im Zitratzyklus verbraucht wird (Kuilman *et al.*, 2010; Kaplon *et al.*, 2013). Darüber hinaus kann p53 die Mengen an Pyruvat-DH Kinase 2 senken und damit die Pyruvat-DH aktivieren (Contractor und Harris, 2012). Die hier präsentierten Daten zeigten allerdings, dass es im Bezug auf die intrazelluläre Pyruvat-Menge nach CPT-11-Behandlung keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien gab. Außerdem gaben die HCT116 Zellen nach der Behandlung mit CPT-11 den glykolytischen Metabolismus nicht zugunsten der energieeffizienteren OXPHOS auf, sondern steigerten parallel zur Glykolyse und Laktatproduktion weitere Stoffwechselwege. Ähnliches wurde für Tumorzellen mit

entkoppelter OXPHOS nach DNP-Behandlung beschrieben (Wu *et al.*, 2007). In diesen Zellen wurde durch die Entkopplung sowohl die Respiration, als auch die Glykolyse-Rate gesteigert. Wie bereits zuvor diskutiert, wäre eine Entkopplung der Atmungskette in den HCT116 Zellen infolge der mitochondrialen Schäden denkbar und könnte die parallele Steigerung der Glykolyse und OXPHOS erklären. Dies wurde allerdings nicht entgültig untersucht.

Durch die Steigerung des gesamten Metabolismus wären die HCT116 Zellen in der Lage gewesen, schnell Grundbausteine für die Synthese neuer Biomoleküle und für die Schadensreparatur zu produzieren. Die Aufnahme und der Verbrauch weiterer Stoffwechselzwischenprodukte sprachen ebenfalls dafür, dass in beiden HCT116 Zelllinien die Synthese neuer Biomoleküle aktiv war. Sie waren dadurch allerdings auch empfindlicher gegenüber Glukosemangel. Dies konnte durch Messung des Zelltods und $\Delta\Psi_M$ Verlusts in HCT116 p53wt Zellen gezeigt werden (Abb. 5.18). Die Behandlung mit CPT-11 war in DMEM mit niedrigem Glukosespiegel deutlich effizienter und löste mehr Apoptose aus als in DMEM mit hohem Glukosespiegel. Die Apoptose war dabei, wie bereits zuvor, stark p53-abhängig. Die HCT116 p53/- zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Medien. Von Vander Heiden *et al.* (2011) wurde zuvor beschrieben, dass Glukose-Mangel zu gesteigerter Apoptose und geringerem mitochondrialem Membranpotential führte. Die p53-negativen Zellen konnten ihrerseits durch die Atmungsketten-Inhibitoren TTFA und Rotenon sensibilisiert werden. Der Metabolismus schien beide Zelllinien vor den Folgen der CPT-11-Behandlung zu schützen.

Der gesteigerte Sauerstoffverbrauch nach CPT-11-Behandlung war, neben dem primären DNA-Schaden selbst, eine weitere Erklärung für die gesteigerten ROS-Spiegel, besonders da der O₂-Verbrauch, genau wie die ROS-Mengen, unabhängig von MS-275 gesteigert wurde. Das intrazellulär gesteigerte Glukose-6-phosphat konnte im PPW weiter zu reduziertem Glutathion (GSH) umgesetzt werden, welches für den Abbau der ROS genutzt werden konnte (Baffy *et al.*, 2011). Die Glukose-6-phosphat DH (G6PDH) katalysiert und reguliert die erste Reaktion die in den PPW führt. Damit steuert G6PDH die NADPH-Produktion sowie die Bildung von GSH und damit den Redoxstatus der Zelle (Kletzien *et al.*, 1994; Fico *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004). Nach CPT-11-Behandlung wurde sowohl mehr reduziertes als auch mehr oxidiertes Glutathion (GSSG) in beiden HCT116 Zelllinien gefunden. GSH ist für Mitochondrien ein wichtiger Schutz vor ROS und oxidativen Schäden (Zhang *et al.*,

2001). Dies sprach dafür, dass das gebildete GSH teilweise direkt durch ROS zu GSSG umgesetzt wurde.

Die Veränderungen des Metabolismus beruhten dabei nicht auf einer gesteigerten Expression mitochondrialer Gene (Abb. 5.14). Vermutlich kam es durch die von Irinotecan verursachte Inhibition der mitochondrialen Topoisomerase I (Pommier, 2006; Diaz und Wellinger, 2009) und den mitochondrialen Schäden, in beiden HCT116 Zelllinien zu einer geringeren mRNA-Expression von COX2 (Komplex IV, UE 2), NDH (Komplex I, UE 1) und CYTB (Abb. 5.14). Die durch CPT-11 deutlich gesteigerte Atmungskettenaktivität schien daher nicht transkriptionell reguliert worden zu sein, sondern auf einem anderen Mechanismus zu beruhen. Eine direkte Regulation der Atmungskettenkomplexe wäre beispielsweise möglich. Komplex IV wird beispielsweise allosterisch in Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung und dem Energieniveau der Zelle reguliert (Wagner *et al.*, 2008; Hüttemann *et al.*, 2012). Darüber hinaus werden die Enzyme der Atmungskette, des Zitratzyklus und des Fettsäure Stoffwechsels durch Acetylierungen reguliert (Zhao *et al.*, 2010; Schwer *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006)

Durch Rotenon und TTFA wurden die beiden Atmungskettenkomplexe I, bzw. II inhibiert und damit der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach CPT-11-Behandlung vermindert (Abb. 5.15). Interessanterweise konnte Chloramphenicol in Kombination mit CPT-11 den Anstieg des Sauerstoffverbrauchs ähnlich stark mindern wie die beiden Inhibitoren. Chloramphenicol ist ein Antibiotikum, dass sowohl bakterielle als auch mitochondriale Ribosomen blockiert und damit die Proteintranslation hemmt (McKee *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). Die mitochondriale Proteintranslation schien daher an die Aktivität der Atmungskette mit beteiligt zu sein. Die Atmungskette wurde vermutlich direkt über die Aktivität der Proteinkomplexe und deren Proteinexpression reguliert. Houtkooper *et al.* (2013) zeigten durch Versuche mit Chloramphenicol, dass die zelluläre Respiration reduziert wird und es zu einer Missbalance zwischen nuklear und mitochondrial kodierten Proteinen in den Mitochondrien kommt. Dies könnte hier ebenfalls der Fall gewesen sein. Endgültig wurde dies jedoch nicht geklärt.

Durch DNA-Schäden verursachte Änderungen des Stoffwechsels wurden bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Rudolf *et al.*, 2012; Gerwitz, 2013; Gottlieb und Vousden, 2010) und können eine Anpassung an genotoxischen Stress sein um Tumorzellen vor weiteren Schäden zu schützen (Loiseau *et al.*, 2009). Vielmehr ist

die durch eine Therapie (*therapy induced senescence*; TIS) oder durch Onkogene induzierte Seneszenz (*oncogene induced senescence*; OIS) ein Mechanismus den Tumorzellen nutzen, um der Chemotherapie zu entgehen (Kaplon *et al.*, 2013). Abhängig von der Art und Dauer des Stresses ist die TIS reversibel und tritt vor Allem während eines Zellzyklusarrests in G1 oder G2/M auf (Rudolf *et al.*, 2012; Gewirtz, 2013; Ewald, 2010). Wie bereits erwähnt, kam es durch CPT-11 in den HCT116 Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und zur ATM-Aktivierung (Haug *et al.*, 2008). Allerdings war alleine der Zellzyklusarrest in der G1 oder G2/M-Phase durch Thymidin- oder Nocodazol-Behandlung, nicht ausreichend um den Sauerstoffverbrauch in HCT116 p53wt Zellen zu steigern (Abb. 5.15). ATM/ATR-Aktivierung und die anschließende Chk1/Chk2-Phosphorylierung können nach Bestrahlung oder Chemotherapie Seneszenz und Autophagie in Zellen auslösen (Ewald *et al.*, 2010; Rudolf *et al.*, 2012; Goehe *et al.*, 2012; Gewirtz, 2013). Dabei schien ein veränderter Stoffwechsel durch Seneszenz in den HCT116 Zellen plausibel, denn für Irinotecan wurde bereits beschrieben, dass diese Substanz Autophagie und Seneszenz in Tumorzellen hervorruft (Rudolf *et al.*, 2012; Stanislav *et al.*, 2013). Dörr *et al.* (2013) zeigten, dass TIS in Tumorzellen zu hohen Glykolyseraten und gesteigerter ATP-Produktion führt. Die Glukose wird dabei weiter zu Pyruvat, Laktat und Zitrat umgesetzt. Außerdem ist die OXPHOS erhöht und Autophagie wird ausgelöst. Dieser Prozess verbraucht viel ATP und der gesteigerte Metabolismus könnte die nötige Energie dazu liefern. Von Stechow *et al.* (2013) beobachteten, dass Cisplatin Veränderungen im Nukleotidmetabolismus, dem Harnstoffzyklus, sowie dem Aminosäuremetabolismus in pluripotenten Stammzellen auslöst. Weitere DNA-schädigende Chemotherapeutika wie Camptothecin und Doxorubicin sind ebenfalls in der Lage, Autophagie und Seneszenz, sowie ROS in Zellen, unabhängig von deren p53-Status, hervorzurufen (Ewald *et al.*, 2010; Goehe *et al.*, 2012). Camptothecin ist bereits nach 24 h Behandlung in der Lage Seneszenz in Tumorzellen auszulösen (Goehe *et al.*, 2012). Irinotecan, als ein Camptothecin-Derivat, sollte dazu ebenfalls in der Lage gewesen sein. Obwohl die Seneszenz und Autophagie von p53 reguliert werden, können sie auch in dessen Abwesenheit ausgelöst werden (Mammucari und Rizzuto, 2010; Stanislav *et al.*, 2013; Kuilman *et al.*, 2010; Rudolf *et al.*, 2012). Die letztendliche Entscheidung zwischen Apoptose oder Seneszenz nach DNA-Schäden ist abhängig von der untersuchten Zelllinie, aber auch von der Aktivität verschiedener Signalwege, wie zum Beispiel die von p53

regulierten Signalwege (Gottlieb und Vousden, 2010). Seneszente Zellen haben einen Wachstumsarrest, einen gesteigerten Metabolismus und einen veränderten Zellphänotyp. Dabei verlieren die Zellen ihre Struktur und sind abgeflacht und verbreitert (Ewald *et al.*, 2010; Kuilman *et al.*, 2010).

Durch Rasterelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass beide HCT116 Zelllinien nach CPT-11-Behandlung flach und verbreitert waren und Merkmale seneszenten Zellen zeigten (Abb. 5.7). Das genaue Ausmaß der Seneszenz in den HCT116 Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend untersucht. Es konnte anhand der Literatur allerdings davon ausgegangen werden, dass CPT-11 in den untersuchten Zelllinien TIS auslöste und dadurch die p53-unabhängigen Veränderungen im Zellstoffwechsel erklärt werden. Parallel dazu könnte eine Entkopplung der Atmungskette durch die mitochondrialen Schäden stattgefunden haben und den Stoffwechsel zusätzlich gesteigert haben.

Der zelluläre Metabolismus kann ein vielversprechendes Ziel sein, um Tumorzellen gezielter zu behandeln und Chemoresistenzen zu umgehen. Raffaghello *et al.* (2008 und 2010; Safdie *et al.*, 2012) zeigten in Hefen, humanen Zellen sowie in Mäusen, dass kurzzeitiger Nahrungsmangel, sogenannte *short-termed starvation* (STS) normales Gewebe vor Chemotherapien schützt, Tumorgewebe jedoch nicht. In einer Patientenstudie konnte gezeigt werden, dass durch zyklischen Nahrungsmangel die Nebeneffekte der Chemotherapie deutlich gesenkt werden und das Tumorwachstum alleine durch das Fasten gemindert wird (Safdie *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). Zur Zeit befindet sich das Liponatanalogon CPI-613 zur Behandlung von Tumoren in der Phase 1 der klinischen Testung. CPI-613 blockiert gezielt mitochondriale Funktionen und verändert deren Redoxbalance (Zacher *et al.*, 2011; Stuart *et al.*, 2014; Pardee *et al.*, 2014).

6.4 Eigene Publikationen im Zusammenhang mit dieser Dissertation

Während meiner Promotion sind im Rahmen von Nebenprojekten und Kooperationen mehrere Publikationen entstanden. Deren Ergebnisse sollen hier kurz zusammengefasst und in Bezug auf die vorliegende Dissertation diskutiert werden.

In Sonnemann *et al.* (2015) wurde die Wirkung von *reactivation of transcriptional reporter activity* (RETRA) auf Ewing's Sarkomzellen (ES Zellen) untersucht. Neben p53 gehören auch p63 und p73 zur p53-Familie der Transkriptionsfaktoren.

Transkriptionell aktiv liegen alle als Tetramer vor. P63 und p73 können Homo- und Heterotetramere miteinander bilden, jedoch nicht mit wildtypischem p53. Dieses bildet Tetramere nur mit sich selbst aus. Allerdings kann mutiertes p53 mit p63 und p73 interagieren und somit deren transkriptionelle Aktivität senken und Tumorprogression fördern. RETRA blockiert die Wechselwirkungen zwischen mutiertem p53 und p73. Dadurch wird die Aktivität von p73 wieder hergestellt. Für die Studie wurden mehrere ES Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status verwendet. Drei der ES Zelllinien enthielten mutiertes p53 (SK-ES-1, RD-ES und RM-82), eine war p53 negativ (SK-N-MC) und zwei enthielten wildtypisches p53 (WE-68 und CADO-ES-1).

Überraschenderweise war RETRA in allen untersuchten Zelllinien wirksam und beschränkte sich nicht, wie es zuvor in der Literatur beschrieben wurde, auf Zellen mit mutiertem p53. Es wurde deutlich, dass RETRA, abhängig von der verwendeten Dosis die Vitalität und Proliferation aller untersuchten Zelllinien senkte. Dabei hatte RETRA auf eine Reihe von Karzinom-, Osteosarkom- und Leukämiezellen mit wildtypischem oder negativem p53-Status keinen Einfluss. Daher war zu vermuten, dass RETRA in den ES Zellen einen p53-unabhängigen Effekt induzierte. RETRA aktivierte den intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Weg und beeinflusste die Genexpression von *MDM2*, *PUMA* und *CDKN1A* (p21) unabhängig vom p53-Status der Zellen. Diese zuvor nicht untersuchte Wirkung von RETRA auf Ewing's Sarkomzellen könnte für die Behandlung von Patienten eine Rolle spielen und den Behandlungserfolg steigern.

RETRA könnte für therapeutische Ansätze alleine oder auch in Kombination mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika Anwendung finden, so wie dies bereits mit HDACi geschieht. Die Behandlung von Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status durch die Kombination zweier Wirkstoffklassen, spielte auch in der vorliegenden Dissertation eine entscheidende Rolle. Beide Arbeiten geben Ansatzpunkte für neue Therapien und führen eventuellen zu einer Steigerung der Behandlungseffizienz und Vermeidung von Resistenzen.

Die Vermeidung von Resistenzen in Kolonkarzinomen gegenüber Chemotherapien hatte auch Deschoemaeker *et al.* (2015) zum Thema. Die Arbeit beschäftigte sich mit p53-abhängigen Signalwegen nach 5-Fluoruracil (5-FU)-Behandlung, wobei gezeigt werden konnte, dass *prolyl hydroxylase domain protein 1* (PDH1) eine bedeutende

Rolle dabei spielte. PDH1, 2 und 3 hydroxylieren verschiedene Proteine infolge von Hypoxie, metabolischem Stress und zellulären Schäden. Die Hydroxylierung kann einerseits zum proteasomalen Abbau, andererseits aber auch zur Regulation der modifizierten Proteine führen. PDH2 und 3 sind in Kolonkarzinomen, im Vergleich zu normalem Gewebe, nur gering exprimiert und könnten daher als Tumorsuppressoren fungieren. Die Arbeit hatte zum Ziel in HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen sowie im Mausmodell, die Interaktionen von PDH1-3 mit p53 nach genotoxischem Stress zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von Serin 15 (pS15) in p53 nach der Behandlung mit 5-FU nur durch den *Knockdown* (KD) von *PDH1* deutlich reduziert wurde. Das gleiche galt für die Behandlung mit CPT-11 und Oxaliplatin. Die KDs von *PDH2* oder 3 hatten darauf keinen Einfluss. Zusätzlich wurde durch den KD von *PDH1* und 5-FU-Behandlung die Apoptose-Rate in HCT116 p53wt erhöht, der resultierende DNA-Schaden verstärkt und damit die Sensitivität gegenüber der Chemotherapie gesteigert. Die HCT116 p53^{-/-} Zellen hingegen wurden davon nicht beeinflusst. Auch in Xenograft-Modellen konnte gezeigt werden, dass der KD von *PDH1* die Sensitivität der Tumore gegenüber 5-FU p53-abhängig verstärkte. PDH1 war in der Lage p53 zu binden und zu hydroxylieren. Die Hydroxylierung förderte die Bindung der Kinase p38 α an p53 nach genotoxischem Stress und damit die Phosphorylierung von S15 in p53. Die Hydroxylierung von p53 durch PDH1 könnte eine neue post-translationale Modifikation von p53 sein und eine bisher noch unbekannte Art der Regulation von p53-Signalwegen.

Sofern PDH1 inhibiert wurde, wurden weniger DNA-Reparaturprozesse gestartet und stattdessen Apoptose in den Zellen ausgelöst und damit die Effizienz der 5-FU-Behandlung verstärkt. Spezifische PDH1-Inhibitoren könnten daher für die klinische Anwendung interessant sein, um Resistenzen gegenüber zytostatischen Chemotherapeutika zu umgehen und deren Wirkung zu verstärken. In der vorliegenden Dissertation wurde ein ähnliches Konzept verfolgt. MS-275 wurde verwendet um p53-abhängig die Wirkung von CPT-11 zu steigern. Dabei konnte gezeigt werden, dass MS-275 in Kombination mit CPT-11 in der Lage war die Apoptose-Rate im Vergleich zur CPT-11-Einzelbehandlung deutlich zu erhöhen. Dabei spielten ebenfalls die post-translationalen Modifikationen von p53 eine entscheidende Rolle, welcher p53-Signalweg aktiviert wurde und ob die mitochondriale Apoptose gestartet wurde. Vermutlich beeinflusste PDH1 auch in den

dargestellten Experimenten der Dissertation p53 und dessen Signalwege. Dies wurde jedoch nicht weiter betrachtet und spielte insofern eine geringere Rolle, da PDH1 nicht inhibiert wurde.

Rauch *et al.* (2014) fasst die Wirkung des Survivin Inhibitors YM155 auf verschiedene Tumorzelllinien zusammen. Survivin gehört zu der Familie des *inhibitor of apoptosis* (IAP) Proteinen und verhindert die Apoptose-Induktion in Zellen. Während des Zellzyklus wird Survivin unterschiedlich stark exprimiert, mit dem Maximum in der G2/M-Phase. Seine Transkription wird unter Anderem von p53, FOXO3A und NF- κ B reguliert und durch Stress induziert. Unter normalen Bedingungen hält p53 die Expression von Survivin niedrig. Nach Stress jedoch, steigert p53 die Proteinexpression des Proteins.

Die Expression von Survivin in Tumoren steht in Zusammenhang mit Metastasierung, Tumorwachstum und -ausbreitung sowie einer schlechten Prognose für den Patienten. Daher ist Survivin ein attraktives Ziel für Therapieansätze und stellt die Schwachstelle einiger Tumore dar. Durch den Einsatz von HDACi kann die Expression von Survivin reduziert werden und einige Tumore damit gezielt behandelt werden. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Survivin Inhibitoren wie YM155. Allerdings beeinflusst YM155 auch andere Proteine und führt damit zu verschiedenen, in diesem Review beschriebenen Nebeneffekten.

Im Bezug auf die vorliegende Dissertation könnte die Expression von Survivin für die beobachteten Effekte eine Rolle gespielt haben. Die HCT116 Zellen wurden durch die Behandlung mit CPT-11 in der G2/M-Phase arretiert, in der die Survivin-Expression am höchsten ist. Zusätzlich sollte p53, aktiviert durch den genotoxischen Stress, die Expression von Survivin zusätzlich induzieren. Der HDACi MS-275 alleine, aber auch in Kombination mit CPT-11, sollte die Survivin-Expression hingegen reduziert haben. Damit könnten die potentiell höheren Survivin-Proteinmengen nach der CPT-11-Einzelbehandlung das Ausmaß der Apoptose, im Vergleich zur kombinierten Behandlung aus CPT-11 und MS-275, eingeschränkt haben.

Die Experimente dieser Dissertation zeigten, dass durch unterschiedliche post-translationalen Modifikationen von p53 verschiedene Signalwege aktiviert wurden und damit zwischen Zellzyklusarrest und Reparatur oder der Initiation der mitochondrialen Apoptose entschieden wurde. Eine Verminderung der Apoptose

durch Survivin nach der CPT-11-Einzelbehandlung könnte diesen Effekt mit unterstützt haben. Auch wäre die Kombination aus YM155 mit CPT-11 eine Möglichkeit, die Wirkung von CPT-11 auf die HCT116 Zellen zu verstärken. Allerdings wurde die Survivin-Expression in der Dissertation nicht untersucht. Daher bleibt dies eine Hypothese.

Sonnemann und Marx *et al.* (2014) befasste sich mit p53-abhängigen und -unabhängigen Effekten verschiedener HDACi. Obwohl HDACi vielversprechende Substanzen zur Behandlung von Tumoren sind, ist deren genauer Wirkmechanismus nicht im Detail bekannt. Der zelluläre p53-Status in Tumoren kann für den Behandlungserfolg von großer Bedeutung sein. Dabei ist die Rolle von p53 bei HDACi-induzierten Effekten nicht vollständig geklärt und es gibt teilweise widersprüchliche Ergebnisse dazu. In dieser Arbeit wurden die Effekte der HDACi Vorinostat (SAHA), Entinostat (MS-275), Apicidin und VPA, des Sirtuin Inhibitors (SIRTi) Tenovin-1 und des Topoisomerase II Inhibitors Etoposid in HCT116 p53wt und p53-/- Zellen verglichen. Dadurch sollten p53-abhängige Effekte von HDACi mit unterschiedlicher Spezifität untersucht werden.

Alle Substanzen verringerten in beiden HCT116 Zelllinien zeit- und dosisabhängig die Zellvitalität. Dabei war die Wirkung von SAHA, Apicidin und VPA nahezu p53-unabhängig. Überraschenderweise zeigten Etoposid, Tenovin-1 und MS-275 deutliche Unterschiede zwischen den HCT116 p53wt und p53-/- Zellen. Durch alle Substanzen wurde die Aktivität der Caspase 3 gesteigert. Wobei das Ausmaß zwischen den Substanzen unterschiedlich war und Etoposid, Tenovin-1 und MS-275 nur in den HCT116 p53wt Zellen die Aktivität deutlich steigerten. zVAD konnte in Kombination mit SAHA in beiden Zelllinien den Zelltod und den Verlust von $\Delta\Psi_M$ verringern, wobei zVAD in Kombination mit MS-275 oder Tenovin-1 dies vor Allem in den HCT116 p53wt Zellen tat. Tenovin-1 zeigte dabei unter den getesteten HDACi die deutlichsten p53-abhängigen Effekte.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression mehrerer Gene untersucht. SAHA, MS-275 und Apicidin reduzierten die mRNA-Mengen von *p53*, *MDM2* und *MDM4*. Tenovin-1 und Etoposid hatten auf p53 keinen Einfluss, steigerten jedoch beide in HCT116 p53wt Zellen die Expression von *MDM2* und *CDKN1A* (p21). Auf Proteinebene induzierten MS-275, SAHA und Tenovin-1 die Expression von p53, acetyliertem p53, und die Spaltung von PARP1 in den HCT116 p53wt Zellen. Durch SAHA wurde

PARP1-Spaltung auch in den HCT116 p53^{-/-} Zellen detektiert. Die Proteinexpression von p21 wurde nur von MS-275 und SAHA in beiden Zelllinien induziert. Tenovin-1 dagegen induzierte p21 nur in den HCT116 p53^{wt} Zellen.

Die Studie zeigte, dass HDACi/SIRTi mit einer höheren Spezifität (MS-275 und Tenovin-1), p53-abhängige Effekte zeigten, wobei unspezifischere HDACi (SAHA und Apicidin) auch p53-unabhängige Effekte auslösten. Dabei zeigte sich bereits, dass MS-275 in der Lage war die Zellvitalität p53-abhängig zu senken und Apoptose auszulösen. Die vorliegende Dissertation befasste sich ebenfalls mit p53-abhängigen und unabhängigen Effekten. MS-275 wurde gewählt um p53-abhängige Effekte in Kombination mit CPT-11 zu verstärken.

6.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigte sich durch die Experimente dieser Arbeit, dass wildtypisches p53 essenziell für die Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Weges war. Der Acetylierungs-Grad, insbesondere die C-terminale Acetylierung, beeinflusste das Ausmaß der Apoptose. Die Kombination aus Irinotecan und Entinostat verstärkte die C-terminale Acetylierung von p53 im Vergleich zu den Einzelbehandlungen deutlich und steigerte die Caspase- und p53-abhängige intrinsische Apoptose. Dabei spielte die transkriptionelle Funktion von p53 eine untergeordnete Rolle. Vielmehr schien dessen Interaktionen an den Mitochondrien mit BCL-2-Familie Proteinen MOMP auszulösen. Die Versuche zeigten, dass durch die kombinierte Behandlung aus CPT-11 und MS-275 der Anteil an acetyliertem p53 im Zytosol und an den Mitochondrien zunahm und dass die Acetylierung des C-Terminus direkt in Zusammenhang mit der mitochondrialen Apoptose stand. Das Acetylierungsmuster von p53 schien weiterhin darüber zu entscheiden, ob p21 und die Zellreparatur aktiviert oder der intrinsische Apoptose-Weg gestartet wurde. Die Behandlung mit CPT-11 führte bereits zu einer starken Acetylierung mehrerer Lysine in p53. Dies führte zu einer geringen Steigerung der Apoptose bei gleichzeitiger p21-Aktivierung. Durch die Kombination mit MS-275 wurde besonders die C-terminale Acetylierung von p53 erhöht und damit wahrscheinlich andere Signalwege aktiviert. Es wurde weniger p21 aktiviert und das Ausmaß an mitochondrialer Apoptose und Caspase 3-Spaltung war deutlich gesteigert. Dies erklärte auch, dass in der p53 6KR-Mutante durch die Kombination aus CPT-11 und MS-275 keine gesteigerte Apoptose ausgelöst werden konnte. Die transkriptionelle Regulation von

wildtypischem p53 spielte damit insofern eine Rolle, dass durch CPT-11 p53-Zielgene wie p21 aktiviert wurden, was nach kombinierter Behandlung mit MS-275 nicht mehr der Fall war und damit die DNA-Schadensantwort beeinflusst wurde.

Zeitgleich wurden Effekte ausgelöst, die rein vom induzierten DNA-Schaden abhingen. Durch CPT-11-Behandlung wurden DNA-Doppelstrangbrüche in den HCT116 Zellen erzeugt. Dadurch wurde ATM und dessen Signalwege aktiviert. In beiden HCT116 Zelllinien kam es infolge dessen zu einer Steigerung des Metabolismus, der vermutlich einen schützenden Effekt gegenüber der Chemotherapie hatte und eine Adaption an den genotoxischen Stress darstellen könnte. Durch die hohe Aktivität des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung wurden die Energie und die Grundbausteine für die Reparatur von zellulären Schäden geliefert. Allerdings trug der Stoffwechsel durch erhöhte ROS-Mengen auch selbst zu weiteren Schäden bei. Durch Autophagie wurden geschädigte Organelle entfernt und die Zellen damit geschützt. Der Metabolismus lieferte die nötigen ATP-Mengen dazu.

Post-translationale Modifikationen von p53 beeinflussten in den HCT116 p53wt Zellen ob und welche Signalwege gestartet wurden. Die primäre Acetylierung des gesamten p53 Proteins durch die Behandlung mit CPT-11 alleine führten dazu, dass neben der Proteinexpression von p21 auch die Autophagie-Menge und die transkriptionelle Aktivität von p53 gesteigert wurde. Durch die Kombination von CPT-11 und MS-275 fand all dies in deutlich geringerem Maße statt. Dafür wurde nach der kombinierten Behandlung durch p53 der intrinsische Apoptose-Weg stärker aktiviert. Die Dauer und Stärke des DNA-Schadens waren dabei vermutlich mit verantwortlich, welche DNA-Schadensantwort ausgelöst und welcher Signalweg von p53 aktiviert wurde. Der Grad der C-terminalen Acetylierung, bzw. die post-translationale Modifikation von p53 traf allerdings die Entscheidung zwischen Zellzyklusarrest und Reparatur oder mitochondrialer Apoptose.

In dieser Arbeit hat sich die Kombination aus Topoisomerase Inhibitor und HDACi als vielversprechend herausgestellt, um wildtypisches p53 in Kolonkarzinomzellen zu aktivieren und deren Zelltod zu initiieren. Irinotecan wird bereits zur Behandlung von Darmkrebs eingesetzt (Pommier, 2006) und Entinostat befindet sich in der Phase 2 der klinischen Erprobung (Wolfson, 2013; Comeau und Labruzzo Mohundro, 2013; Arrowsmith *et al.*, 2012). Die Kombination beider Substanzen könnte die Wirkung von Irinotecan deutlich steigern und dazu beitragen Tumore besser zu behandeln.

7 Literaturverzeichnis

1. Achanta G, Sasaki R, Feng L, Carew JS, Lu W, Pelicano H, Keating MJ, Huang P, Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J* (2005) **24**, No. 19, pp. 3482-3492
2. Akiyama T, Dass CR, Choong PF, Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther* (2009) **8**, No. 12, pp. 3173-3180
3. Aliouat-Denis CM, Dendouga N, Van den Wyngaert I, Goehlmann H, Steller U, van de Weyer I, Van Slycken N, Andries L, Kass S, Luyten W, Janicot M, Vialard JE, p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res* (2005) **3**, No. 11, pp. 627-634
4. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* (1999) **23**, No. 2, pp. 147 ff.
5. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* (1981) **290**, No. 5806, pp. 457-465
6. Appella E, Anderson CW, Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* (2001) **268**, No. 10, pp. 2764-2772
7. Arbely E, Natan E, Brandt T, Allen MD, Veprintsev DB, Robinson CV, Chin JW, Joerger AC, Fersht AR, Acetylation of lysine 120 of p53 endows DNA-binding specificity at effective physiological salt concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**, No. 20, pp. 8251-8256
8. Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M, Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2012) **11**, No. 5, pp. 384-400
9. Attardi G, Schatz G, Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* (1988) **4**, pp. 289-333
10. Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K, Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* (1997) **89**, No. 7, pp. 1175-1184
11. Baffy G, Derdak Z, Robson SC, Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *British Journal of Cancer* (2011) **105**, pp. 469-474
12. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y, Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* (1998) **281**, No. 5383, pp. 1674-1677
13. Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL, Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* (2001) **8**, No. 6, pp. 1243-1254
14. Benkirane M, Sardet C, Coux O, Lessons from interconnected ubiquitylation and acetylation of p53: think metastable networks. *Biochem Soc Trans* (2010) **38**, No. 1, pp. 98-103
15. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH, TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* (2006) **126**, No. 1, pp. 107-120.

16. Berridge MV, Tan AS, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* (1993) **303**, No. 2, pp. 474-482
17. Binder DR, Dunn WH Jr, Swerdlow RH, Molecular characterization of mtDNA depleted and repleted NT2 cell lines. *Mitochondrion* (2005) **5**, No. 4, pp. 255-265
18. Biswas G, Guha M, Avadhani NG, Mitochondria-to-nucleus stress signaling in mammalian cells: nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis. *Gene* (2005) **354**, pp. 132-139
19. Blattner C, Hay T, Meek DW, Lane DP, Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol* (2002) **22**, No. 17, pp. 6170-6182
20. Bode AM, Dong Z, Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* (2004) **4**, No. 10, pp. 793-805
21. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM, Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* (2004) **304**, No. 5670, pp. 596-600
22. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X, Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* (1999) **15**, pp. 269-290
23. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr, Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* (1999) **18**, No. 23, pp. 6845-6854
24. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* (1998) **282**, No. 5393, pp. 1497-1501
25. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) **72**, pp. 248-254
26. Brand KA, Hermfisse U, Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* (1997) **11**, No. 5, pp. 388-395
27. Brenner C, Grimm S, The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* (2006) **25**, No. 34, pp. 4744-4756
28. Brooks C, Cho SG, Wang CY, Yang T, Dong Z, Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* (2011) **300**, No. 3, pp. 447-455
29. Brooks CL (a), Gu W, p53 regulation by ubiquitin. *FEBS Lett* (2011) **585**, No. 18, pp. 2803-2809
30. Brooks CL (b), Gu W, The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* (2011) **2**, No. 6, pp. 456-462
31. Cantor JR, Sabatini DM, Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* (2012) **2**, No. 10, pp. 881-898
32. Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P, The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* (2004) **16**, No. 5, pp. 807-818

33. Carvajal LA, Manfredi JJ, Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep* (2013) **14**, No. 5, pp. 414-421
34. Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Poli R, Bosco O, Mastrocola R, Aragno M, Boccuzzi G, Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cells. *J Endocrinol* (2006) **191**, No. 2, pp. 465-472
35. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A, Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* (2006) **9**, No. 5, pp. 351-365
36. Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, Kuksin D, Lin B, Qiu J, A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* (2012) **8**, No. 9, pp. 1371-1382
37. Chandra D, Choy G, Daniel PT, Tang DG, Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2. *J Biol Chem* (2005) **280**, No. 19, pp. 19051-19061
38. Chao C, Wu Z, Mazur SJ, Borges H, Rossi M, Lin T, Wang JY, Anderson CW, Appella E, Xu Y, Acetylation of mouse p53 at lysine 317 negatively regulates p53 apoptotic activities after DNA damage. *Mol Cell Biol* (2006) **26**, No. 18, pp. 6859-6869
39. Chen K, Albano A, Ho A, Keaney JF Jr, Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. *J Biol Chem* (2003) **278**, No. 41, pp. 39527-39533
40. Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S, Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* (2007) **67**, No. 2, pp. 782-791
41. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C, p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* (1996) **10**, No. 19, pp. 2438-2451
42. Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM, Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* (1996) **379**, No. 6565, pp. 554-556
43. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ, BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* (2001) **8**, No. 3, pp. 705-711
44. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ, VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* (2003) **301**, No. 5632, pp. 513-517
45. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR, Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* (2004) **303**, No. 5660, pp. 1010-1014
46. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR, PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* (2005) **309**, No. 5741, pp. 1732-1735
47. Chipuk JE, Green DR, Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) **6**, No. 3, pp. 268-275

48. Chipuk JE, Green DR, How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* (2008) **18**, No. 4, pp. 157-164
49. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ, A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* (1995) **14**, No. 22, pp. 5589-5596
50. Choi HK, Choi Y, Kang H, Lim EJ, Park SY, Lee HS, Park JM, Moon J, Kim YJ, Choi I, Joe EH, Choi KC, Yoon HG, PINK1 positively regulates HDAC3 to suppress dopaminergic neuronal cell death. *Hum Mol Genet* (2015) **24**, No. 4, pp. 1127-1141
51. Chou TC, Talalay P, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* (1984) **22**, pp. 27-55
52. Clark LC Jr, Wolf R, Granger D, Taylor Z, Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* (1953) **6**, No. 3, pp. 189-193
53. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Scorrano L, Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* (2013) **155**, No. 1, pp. 160-171
54. Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM, Green DR, GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* (2007) 129, No. 5, pp. 983-997
55. Comeau JM, Labruzzo Mohundro B, From bench to bedside: promising colon cancer clinical trials. *Am J Manag Care* (2013) **19**, SP32-7 [Epub]
56. Contractor T, Harris CR, p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res* (2012) **72**, No. 2, pp. 560-567
57. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC, Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* (2004) **33**, No. 2, pp. 95-103
58. Dang CV, Semenza GL, Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* (1999) 24, No. 2, pp. 68-72
59. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A, The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta* (2011) **1807**, pp. 568-576
60. de la Loza MC, Wellinger RE, A novel approach for organelle-specific DNA damage targeting reveals different susceptibility of mitochondrial DNA to the anticancer drugs camptothecin and topotecan. *Nucleic Acids Res* (2009) **37**, No. 4, e26 [Epub]
61. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G, Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* (2002) **21**, No. 57, pp. 8786-803
62. Denizot F, Lang R, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* (1986) **89**, No. 2, pp. 271-277

63. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC, Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* (1999) **144**, No. 5, pp. 891-901
64. Deschoemaeker S, Di Conza G, Lilla S, Martín-Pérez R, Mennerich D, Boon L, Hendriks S, Maddocks OD, Marx C, Radhakrishnan P, Prenen H, Schneider M, Myllyharju J, Kietzmann T, Vousden KH, Zanivan S, Mazzone M, PHD1 regulates p53-mediated colorectal cancer chemoresistance. *EMBO Mol Med* (2015) **7**, pp. 1350-1365
65. Desquiere V, Loiseau D, Jacques C, Douay O, Malthiery Y, Ritz P, Roussel D, Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1757**, No. 1, pp. 21-30
66. Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JHM, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfürst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Gräler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dörken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S, Schmitt CA, Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* (2013) **501**, pp. 421 ff.
67. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ, The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell* (2012) **48**, No. 4, pp. 612-626
68. D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S, Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* (2002) **4**, No. 1, pp. 11-19
69. Dos Santos Ferreira AC, Fernandes RA, Kwee JK, Klumb CE, Histone deacetylase inhibitor potentiates chemotherapy-induced apoptosis through Bim upregulation in Burkitt's lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* (2012) **138**, No. 2, pp. 317-25
70. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* (1998) **391**, No. 6662, pp. 43-50
71. Eruslanov E, Kusmartsev S, Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* (2010) **594**, pp. 57-72
72. Esaki M, Kanamori T, Nishikawa S, Shin I, Schultz PG, Endo T, Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation. *Nat Struct Biol* (2003) **10**, No. 12, pp. 988-994
73. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC, Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* (2000) **20**, No. 3, pp. 929-935
74. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF, Therapy-Induced Senescence in Cancer. *J Natl Cancer Inst* (2010) **102**, No. 20, pp. 1536-1546
75. Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, Dupuy F, Chambers C, Fuerth BJ, Viollet B, Mamer OA, Avizonis D, DeBerardinis RJ, Siegel PM, Jones RG, AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* (2013) **17**, No. 1, pp. 113-124

76. Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuier A, Berson A, Mansouri A, Fau D, Pessayre D, Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* (2000) **31**, No. 3, pp. 674-683
77. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* (1989) **246**, No. 4926, pp. 64-71
78. Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y, Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol* (2005) **25**, No. 13, pp. 5389-5395
79. Ferber EC, Peck B, Delpuech O, Bell GP, East P, Schulze A, FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ* (2012) **19**, No. 6, pp. 968-979
80. Fico A, Paglialunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G, Iaccarino I, Filosa S, Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* (2004) **11**, No. 8, pp. 823-831
81. Flatmark K, Nome RV, Folkvord S, Bratland A, Rasmussen H, Ellefsen MS, Fodstad Ø, Ree AH, Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiat Oncol* (2006) **1**, p. 25
82. Friedman PN, Chen X, Bargonetti J, Prives C, The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) **90**, No. 8, pp. 3319-3323
83. Fujiki Y (a), Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB, Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* (1982) **93**, No. 1, pp. 97-102
84. Fujiki Y (b), Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB, Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol* (1982) **93**, No. 1, pp. 103-110
85. Gewirtz DA, Autophagy and senescence: A partnership in search of definition. *Autophagy* (2013) **9**, No. 5, pp. 808-812
86. Goehe RW, Di X, Sharma K, Bristol ML, Henderson SC, Valerie K, Rodier F, Davalos AR, Gewirtz DA, The Autophagy-Senescence Connection in Chemotherapy: Must Tumor Cells (Self) Eat Before They Sleep? *J Pharmacol Exp Ther.* (2012) **343**, No. 3, pp. 763-778
87. Goldstein JC, Muñoz-Pinedo C, Ricci JE, Adams SR, Kelekar A, Schuler M, Tsien RY, Green DR, Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* (2005) **12**, No. 5, pp. 453-462
88. Gonfloni S, Iannizzotto V, Maiani E, Bellusci G, Ciccone S, Diederich M, P53 and SIRT1: routes of metabolism and genome stability. *Biochem Pharmacol* (2014) **92**, No. 1, pp. 149-156
89. Goodman RH, Smolik S, CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* (2000) **14**, No. 13, pp. 1553-1577
90. Gottlieb E, Vousden KH, p53 Regulation of Metabolic Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010) **2**, No. 4, pp. 1-10

91. Graham JM, Isolation of mitochondria from tissues and cells by differential centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* (2001) **Chapter 3, Unit 3.3**
92. Green DR, Kroemer G, The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* (2004) **305, No. 5684**, pp. 626-629
93. Gu W, Roeder RG, Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* (1997) **90, No. 4**, pp. 595-606
94. Guja KE, Garcia-Diaz M, Hitting the brakes: termination of mitochondrial transcription. *Biochim Biophys Acta* (2012) **1819, No. 9-10**, pp. 939-947
95. Gustafsson AB, Gottlieb RA, Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol* (2007) **292, No. 1**, pp. 45-51
96. Han J, Goldstein LA, Hou W, Gastman BR, Rabinowich H, Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J Biol Chem* (2010) **285, No. 29**, pp. 22473-22483
97. Hagenbuchner J, Kuznetsov A, Hermann M, Hausott B, Obexer P, Ausserlechner MJ, FOXO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L11 (Bim) and SESN3. *J Cell Sci* (2012) **125, No. 5**, pp. 1191-1203
98. Hager KM, Gu W, Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis* (2014) **35, No. 4**, pp. 740-746
99. Hainaut P, Hollstein M, p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* (2000) **77**, pp. 81-137
100. Harris JR, Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey. *Arch Biochem Biophys* (2014) pii: S0003-9861(14)00400-7 [Epub]
101. Haug K, Kravik KL, De Angelis PM, Cellular response to irinotecan in colon cancer cell lines showing differential response to 5-fluorouracil. *Anticancer Res* (2008) **28, No. 2A**, pp. 583-592
102. Herrmann JM, Neupert W, Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* (2000) **3, No. 2**, pp. 210-214
103. Hemann MT, Lowe SW, The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ* (2006) **13, No. 8**, pp. 1256-1259
104. Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini, Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* (2003) **278, No. 14**, pp. 12579-12589
105. Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, Politz O, MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent. *Int J Biochem Cell Biol* (2007) **39, No. 7-8**, pp. 1388-1405
106. Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P, Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100, No. 25**, pp. 15035-15040
107. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL, Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* (2003) **24, No. 1**, pp. 3-12

108. Hofmann TG1, Möller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Dröge W, Will H, Schmitz ML, Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* (2002) **4**, No. 1, pp. 1-10
109. Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, Moullan N, Katsyuba E, Knott G, Williams RW, Auwerx J, Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* (2013) **497**, No. 7450, pp. 451-457
110. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ, Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**, No. 23, pp. 12401-12406
111. Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z, Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**, No. 16, pp. 7455-7460
112. Hupp TR, Lane DP, Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* (1994) **4**, No. 10, pp. 865-875
113. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC, p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* (2004) **64**, No. 7, pp. 2350-2356
114. Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP, p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* (2001) **20**, No. 6, pp. 1331-1340
115. Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP, Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* (2003) **4**, No. 4, pp. 321-328
116. Jiang P, Du W, Heese K, Wu M, The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* (2006) **26**, No. 23, pp. 9071-9082
117. Joerger AC, Fersht AR, Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* (2008) **77**, pp. 557-582
118. Johnson RF, Witzel II, Perkins ND, p53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF- κ B. *Cancer Res* (2011) **71**, No. 16, pp. 5588-5597
119. Johnson RF, Perkins ND, Nuclear factor- κ B, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends Biochem Sci* (2012) **37**, No. 8, pp. 317-324
120. Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW, Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* (2000) **275**, No. 27, pp. 20436-20443
121. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela I, Kaminski N, Getz G, Domany E, Givol D, DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* (2001) **20**, No. 18, pp. 2225-2234
122. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, van der Burg SH, Verdegaal EM, Cascante M, Shlomi T, Gottlieb E, Peeper DS, A key role for mitochondrial

- gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* (2013) **498**, No. **7452**, pp. 109-112
123. Kao LP, Ovchinnikov D, Wolvetang E, The effect of ethidium bromide and chloramphenicol on mitochondrial biogenesis in primary human fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* (2012) **261**, No. **1**, pp. 42-49
 124. Karas M, Hillenkamp F, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* (1988) **60**, No. **20**, pp. 2299-2301
 125. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N, p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* (2008) **10**, No. **5**, pp. 611-618
 126. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH, Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* (2006) **8**, No. **12**, pp. 1348-1358
 127. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ, Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* (2007) **462**, No. **2**, pp. 245-253
 128. Kim MY, Zhang T, Kraus WL, Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* (2005) **19**, No. **17**, pp. 1951-1967
 129. Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y, Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* (2006) **23**, No. **4**, pp. 607-618
 130. King ME, Godman GC, King DW, Respiratory enzymes and mitochondrial morphology of HeLa and L cells treated with chloramphenicol and ethidium bromide. *J Cell Biol* (1972) **53**, No. **1**, pp. 127-142
 131. Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* (1994) **8**, No. **2**, pp. 174-181
 132. Knights CD, Catania J, Di Giovanni S, Muratoglu S, Perez R, Swartzbeck A, Quong AA, Zhang X, Beerman T, Pestell RG, Avantiaggiati ML, Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* (2006) **173**, No. **4**, pp. 533-544
 133. Knott G, Genoud C, Is EM dead? *J Cell Sci* (2013) **126**, No. **20**, pp.4545-4552
 134. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, Deng X, Zhai D, Shi YX, Sneed T, Verhaegen M, Soengas M, Ruvolo VR, McQueen T, Schober WD, Watt JC, Jiffar T, Ling X, Marini FC, Harris D, Dietrich M, Estrov Z, McCubrey J, May WS, Reed JC, Andreeff M, Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* (2006) **10**, No. **5**, pp. 375-388
 135. Koppen M, Langer T, Protein Degradation within Mitochondria: Versatile Activities of AAA Proteases and Other Peptidases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (2007) **42**, pp. 221-242
 136. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH, Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* (2000) **7**, No. **12**, pp. 1166-1173

137. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH, Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* (1997) **387**, No. 6630, pp. 299-303
138. Kubli DA, Gustafsson ÅB, Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* (2012) **111**, No. 9, pp.1208-1221
139. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS, The essence of senescence. *Genes Dev.* (2010) **24**, pp. 2463-2479
140. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD, Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* (2002) **111**, No. 3, pp. 331-342
141. Krämer OH, Knauer SK, Zimmermann D, Stauber RH, Heinzel T, Histone deacetylase inhibitors and hydroxyurea modulate the cell cycle and cooperatively induce apoptosis. *Oncogene* (2008) **27**, No. 6, pp. 732-740
142. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* (2007) **87**, No. 1, pp. 99-163
143. Krummel KA, Lee CJ, Toledo F, Wahl GM, The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**, No. 29, pp. 10188-10193
144. Kruse JP, Gu W, Modes of p53 regulation. *Cell* (2009) **137**, No. 4, pp. 609-622
145. Labuschagne CF, van den Broek NJF, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks ODK, Serine, but Not Glycine, Supports One-Carbon Metabolism and Proliferation of Cancer Cells. *Cell reports* (2014) **7**, pp. 1–11
146. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, No. 5259, pp. 680-685
147. Lakshmaiah KC, Jacob LA, Aparna S1, Lokanatha D, Saldanha SC, Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *J Cancer Res Ther* (2014) **10**, No. 3, pp. 469-478
148. Laptenko O, Shiff I, Freed-Pastor W, Zupnick A, Mattia M, Freulich E, Shamir I, Kadouri N, Kahan T, Manfredi J, Simon I, Prives C, The p53 C Terminus Controls Site-Specific DNA Binding and Promotes Structural Changes within the Central DNA Binding Domain. *Mol Cell* (2015) **57**, No. 6, pp. 1034-1046
149. Lee C (a), Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, Pistoia V, Wei M, Hwang S, Merlino A, Emionite L, de Cabo R, Longo VD. Fasting Cycles Retard Growth of Tumors and Sensitize a Range of Cancer Cell Types to Chemotherapy. *Sci Transl Med* (2012) **4**, No. 124, 124ra27 [Epub]
150. Lee CW (b), Wong LL, Tse EY, Liu HF, Leong VY, Lee JM, Hardie DG, Ng IO, Ching YP, AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer Res* (2012) **72**, No. 17, pp. 4394-4404
151. Lee JT, Gu W, SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes Cancer* (2013) **4**, No. 3-4, pp. 112-117
152. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ, Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* (2002) **2**, No. 3, pp. 183-192

153. Letai AG, Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* (2008) **8**, No.2, pp. 121-132
154. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL, Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* (2004) **6**, No. 5, pp. 443-450
155. Li AG, Piluso LG, Cai X, Gadd BJ, Ladurner AG, Liu X, An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment. *Mol Cell* (2007) **28**, No. 3, pp. 408-421
156. Li CH, Cheng YW, Liao PL, Yang YT, Kang JJ, Chloramphenicol causes mitochondrial stress, decreases ATP biosynthesis, induces matrix metalloproteinase-13 expression, and solid-tumor cell invasion. *Toxicol Sci* (2010) **116**, No. 1, pp. 140-150
157. Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W, Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* (2002) **277**, No. 52, pp. 50607-50611
158. Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W, Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* (2002) **416**, No. 6881, pp. 648-653
159. Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W, Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* (2003) **302**, No. 5652, pp. 1972-1975
160. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R, p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* (1999) **18**, No. 21, pp. 6027-6036
161. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W, Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* (2012) **149**, No. 6, pp. 1269-1283
162. Li Z, Graham BH, Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods Mol Biol* (2012) **837**, pp. 63-72
163. Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J, Livingston DM, Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* (1997) **387**, No. 6635, pp. 823-827
164. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB, The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* (2000) **6**, No. 6, pp. 1389-1399
165. Liu B, Chen Y, St Clair DK, ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* (2008) **44**, No. 8, pp. 1529-1535
166. Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL, p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* (1999) **19**, No. 2, pp. 1202-1209
167. Liu Z, Lu H, Shi H, Du Y, Yu J, Gu S, Chen X, Liu KJ, Hu CA, PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* (2005) **65**, No. 5, pp. 1647-1654
168. Lohrum MA, Woods DB, Ludwig RL, Bálint E, Vousden KH, C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol* (2001) **21**, No. 24, pp. 8521-8532

169. Loiseau D, Morvan D, Chevrollier A, Demidem A, Douay O, Reynier P, Stepien G, Mitochondrial Bioenergetic Background Confers a Survival Advantage to HepG2 Cells in Response to Chemotherapy. *Molecular Carcinogenesis* (2009) **48**, pp. 733-741
170. Lucas DM, Davis ME, Parthun MR, Mone AP, Kitada S, Cunningham KD, Flax EL, Wickham J, Reed JC, Byrd JC, Grever MR, The histone deacetylase inhibitor MS-275 induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* (2004) **18**, No. 7, pp. 1207-1214
171. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W, Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* (2000) **408**, No. 6810, pp. 377-381
172. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W, Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* (2001) **107**, No. 2, pp. 137-148
173. Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W, Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**, No. 8, pp. 2259-2264
174. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X, Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* (1998) **94**, No. 4, pp. 481-490
175. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T, p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* (1995) **9**, No. 8, pp. 935-944
176. Maddocks OD, Vousden KH, Metabolic regulation by p53. *J Mol Med (Berl)* (2011) **89**, No. 3, pp. 237-245
177. Maddocks ODK, Berkens CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH, Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* (2013) **493**, pp. 542-546
178. Mahyar-Roemer M, Roemer K, p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* (2001) **20**, No. 26, pp. 3387-3398
179. Mammucari C, Rizzuto R, Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mechanisms of Ageing and Development* (2010) **131**, pp. 536-543
180. Mann M, Jensen ON, Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* (2003) **21**, No. 3, pp. 255-261
181. Mann M, Kelleher NL, Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**, No. 47, pp. 18132-18138
182. Mannella CA, Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1763**, No. 5-6, pp. 542-548
183. Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine NR, Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* (2002) **22**, No. 11, pp. 3577-3589

184. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM, Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* (2000) **275**, No. 21, pp. 16202-16212
185. Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM, Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J* (2007) **26**, No. 4, pp. 923-934
186. Marine JC, Jochemsen AG, Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **331**, No. 3, pp. 750-760
187. Martin W, Russell MJ, On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2003) **358**, No. 1429, pp. 59-83
188. Martindale JL, Holbrook NJ, Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* (2002) **192**, No. 1, pp. 1-15
189. Martinou JC, Youle RJ, Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* (2011) **21**, No. 1, pp. 92-101
190. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM, p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* (2006) **312**, No. 5780, pp. 1650-1653
191. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S, Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* (2006) **16**, No. 14, pp. 551-560
192. McKee EE, Ferguson M, Bentley AT, Marks TA, Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob Agents Chemother* (2006) **50**, No. 6, pp. 2042-2049
193. Mediavilla-Varela M, Pacheco FJ, Almaguel F, Perez J, Sahakian E, Daniels TR, Leoh LS, Padilla A, Wall NR, Lilly MB, De Leon M, Casiano CA, Docetaxel-induced prostate cancer cell death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by LEDGF/p75. *Mol Cancer* (2009) **8**, pp. 68 ff.
194. Mellert HS, Stanek TJ, Sykes SM, Rauscher FJ 3rd, Schultz DC, McMahon SB, Deacetylation of the DNA-binding domain regulates p53-mediated apoptosis. *J Biol Chem* (2011) **286**, No. 6, pp. 4264-4270
195. Métivier D, Dallaporta B, Zamzami N, Larochette N, Susin SA, Marzo I, Kroemer G, Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett* (1998) **61**, No. 2-3, pp. 157-163
196. Michaelis M1, Rothweiler F, Barth S, Cinatl J, van Rikxoort M, Löschmann N, Voges Y, Breitling R, von Deimling A, Rödel F, Weber K, Fehse B, Mack E, Stiewe T, Doerr HW, Speidel D, Cinatl J J, Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells. *Cell Death Dis* (2011) **2**:e243 [Epub]
197. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM, p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* (2003) **11**, No. 3, pp. 577-590
198. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W, Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* (2005) **17**, No. 6, pp. 631-636

199. Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* (1983) **65**, No. 1-2, pp. 55-63
200. Munoz-Gamez JA, Rodriguez-Vargas JM, Quiles-Perez R, Aguilar-Quesada R, Martin-Oliva D, de Murcia G, de Murcia JM, Almendros A, de Almodovar MR, Oliver FJ, PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* (2009) **5**, No. 1, pp. 1-14
201. Murphy MP, How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J* (2009) **417**, pp. 1-13
202. Muscolini M, Montagni E, Palermo V, Di Agostino S, Gu W, Abdelmoula-Souissi S, Mazzoni C, Blandino G, Tuosto L, The cancer-associated K351N mutation affects the ubiquitination and the translocation to mitochondria of p53 protein. *J Biol Chem* (2011) **286**, No. 46, pp. 39693-39702
203. Nagata S, Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* (2000) **256**, No. 1, pp. 12-18
204. Nakano K, Vousden KH, PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* (2001) **7**, No. 3, pp. 683-694
205. Nemajerova A, Erster S, Moll UM, The post-translational phosphorylation and acetylation modification profile is not the determining factor in targeting endogenous stress-induced p53 to mitochondria. *Cell Death Differ* (2005) **12**, No. 2, pp. 197-200
206. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* (1991) **139**, No. 2, pp. 271-279
207. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E, Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* (1998) **102-103**, pp. 139-142
208. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y, p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* (2000) **102**, No. 6, pp. 849-862
209. Okamura S, Ng CC, Koyama K, Takei Y, Arakawa H, Monden M, Nakamura Y, Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncol Res* (1999) **11**, No. 6, pp. 281-285
210. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH, An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* (2005) **435**, No. 7042, pp. 677-681
211. Ortega AL, Mena S, Estrela JM, Glutathione in cancer cell death. *Cancers (Basel)* (2011) **3**, No. 1, pp. 1285-1310
212. Ozgen U, Savaşan S, Buck S, Ravindranath Y, Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Cytometry* (2000) **42**, No. 1, pp. 74-78
213. Palani CD, Beck JF, Sonnemann J, Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression. *Invest New Drugs* (2012) **30**, No. 1, pp. 25-36

214. Pardee TS, Lee K, Luddy J, Maturo C, Rodriguez R, Isom S, Miller LD, Stadelman KD, Levitan D, Hurd D, Ellis LR, Harrelson R, Manuel M, Dralle S, Lysterly S, Powell BL, A Phase I Study of the First-in-Class Antimitochondrial Metabolism Agent, CPI-613, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* (2014) **20**, No. 20, pp. 5255-5264
215. Pesole G, Allen JF, Lane N, Martin W, Rand DM, Schatz G, Saccone C, The neglected genome. *EMBO Rep* (2012) **13**, No. 6, pp. 473-474
216. Pestka S, Inhibitors of ribosome functions. *Annu Rev Microbiol* (1971) **25**, pp. 487-562
217. Pietsch EC, Perchiniak E, Canutescu AA, Wang G, Dunbrack RL, Murphy ME, Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J Biol Chem* (2008) **283**, No. 30, pp. 21294-21304
218. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ, Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis* (2011) **41**, No. 3, pp. 661-668
219. Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G, BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* (2001) **276**, No. 41, pp. 37887-37894
220. Pommier Y, Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* (2006) **6**, No. 10, pp. 789-802
221. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD, Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *PNAS* (2008) **105**, No. 24, pp. 8215-8220
222. Raffaghello L, Safdie F, Bianchi G, Dorff T, Fontana L, Longo VD, Fasting and differential chemotherapy protection in patients. *Cell Cycle* (2010) **9**, No. 22, pp. 4474-4476
223. Rauch A, Hennig D, Schäfer C, Wirth M, Marx C, Heinzl T, Schneider G, Krämer OH, Survivin and YM155: how faithful is the liaison? *Biochim Biophys Acta* (2014) **1845**, No. 2, pp. 202-220
224. Redon CE, Weyemi U, Parekh PR, Huang D, Burrell AS, Bonner WM, γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim Biophys Acta* (2012) **1819**, No. 7, pp. 743-756
225. Reed JC, Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* (2008) **111**, No. 7, pp. 3322-3330
226. Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT, Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* (2000) **20**, No. 22, pp. 8458-8467
227. Rosato RR, Almenara JA, Grant S, The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1. *Cancer Res* (2003) **63**, No. 13, pp. 3637-3645
228. Royall JA, Ischiropoulos H, Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* (1993) **302**, No. 2, pp. 348-355
229. Rudolf E, John S, Cervinka M, Irinotecan induces senescence and apoptosis in colonic cells in vitro. *Toxicology Letters* (2012) **214**, pp. 1-8

230. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* (2005) **11**, No. 12, pp. 1306-1313
231. Safdie FM, Dorff T, Quinn D, Fontana L, Wei M, Lee C, Cohen P, Longo VD, Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. *Aging (Albany NY)* (2009) **1**, No. 12, pp. 988-1007
232. Safdie F, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, Conti PS, Chen TC, Longo VD, Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One* (2012) **7**, No. 9, e44603 [Epub]
233. Sagan L, On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* (1967) **14**, No. 3, pp. 255-274
234. Saito S, Goodarzi AA, Higashimoto Y, Noda Y, Lees-Miller SP, Appella E, Anderson CW, ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* (2002) **277**, No. 15, pp. 12491-12494
235. Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E, DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* (1998) **12**, No. 18, pp. 2831-2841
236. Scheibye-Knudsen M, Ramamoorthy M, Sykora P, Maynard S, Lin PC, Minor RK, Wilson DM 3rd, Cooper M, Spencer R, de Cabo R, Croteau DL, Bohr VA, Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *J Exp Med* (2012) **209**, No. 4, pp. 855-869
237. Schon O, Friedler A, Bycroft M, Freund SM, Fersht AR, Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol* (2002) **323**, No. 3, pp. 491-501
238. Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC, Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1988) **155**, No. 3, pp. 1360-1365
239. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E, The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* (2004) **64**, No. 7, pp. 2627-2633
240. Schwer B, Eckersdorff M, Li Y, Silva JC, Fermin D, Kurtev MV, Giallourakis C, Comb MJ, Alt FW, Lombard DB, Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging Cell* (2009) **8**, No. 5, pp. 604-606
241. Sgonc R, Gruber J, Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* (1998) **33**, No. 6, pp. 525-533
242. Shang Q, Zhang D, Guo C, Lin Q, Guo Z, Deng C, Potential synergism of Bim with p53 in mice with Myc-induced lymphoma in a mouse lymphoma model. *Mol Med Rep* (2012) **5**, No. 6, pp. 1401-1408
243. Sheu SS, Nauduri D, Anders MW, Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochimica et Biophysica Acta* (2006) **1762**, pp. 256-265
244. Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* (1997) **11**, No. 24, pp. 3471-3481
245. Smeenk L, Lohrum M, Behind the scenes: unravelling the molecular mechanisms of p53 target gene selectivity (Review). *Int J Oncol* (2010) **37**, No. 5, pp. 1061-1070

246. Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, Huber LJ, Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* (2006) **26**, No. 1, pp. 28-38
247. Sonnemann J, Marx C, Becker S, Wittig S, Palani CD, Krämer OH, Beck JF, p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer* (2014) **110**, No. 3, pp. 656-667
248. Sonnemann J, Grauel D, Blümel L, Hentschel J, Marx C, Blumrich A, Focke K, Becker S, Wittig S, Schinkel S, Krämer OH, Beck JF, RETRA exerts anticancer activity in Ewing's sarcoma cells independent of their TP53 status. *Eur J Cancer* (2015) **51**, No. 7, pp. 841-851
249. Sot B, Freund SM, Fersht AR, Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* (2007) **282**, No. 40, pp. 29193-29200
250. Stanislav J, Mls J, Cervinka M, Rudolf E, The role of autophagic cell death and apoptosis in irinotecan-treated p53 null colon cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* (2013) **13**, No. 5, pp. 811-820
251. Stauber RH, Knauer SK, Habtemichael N, Bier C, Unruhe B, Weisheit S, Spange S, Nonnenmacher F, Fetz V, Ginter T, Reichardt S, Liebmann C, Schneider G, Krämer OH, A combination of a ribonucleotide reductase inhibitor and histone deacetylase inhibitors downregulates EGFR and triggers BIM-dependent apoptosis in head and neck cancer. *Oncotarget* (2012) **3**, No. 1, pp. 31-43
252. Stuart SD, Schauble A, Gupta S, Kennedy AD, Keppler BR, Bingham PM, Zachar Z, A strategically designed small molecule attacks alpha-ketoglutarate dehydrogenase in tumor cells through a redox process. *Cancer Metab* (2014) **2**, No. 1, pp. 4 ff.
253. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB, Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* (2006) **24**, No. 6, pp. 841-851
254. Sykes SM, Stanek TJ, Frank A, Murphy ME, McMahon SB, Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *J Biol Chem* (2009) **284**, No. 30, pp. 20197-20205
255. Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W, Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* (2006) **24**, No. 6, pp. 827-839
256. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W, Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* (2008) **133**, No. 4, pp. 612-626
257. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G, Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* (2008) **10**, No. 6, pp. 676-687
258. Teckman JH, An JK, Blumenkamp K, Schmidt B, Perlmutter D, Mitochondrial autophagy and injury in the liver in α_1 -antitrypsin deficiency. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (2004) **286**, No. 5, pp. 851-862

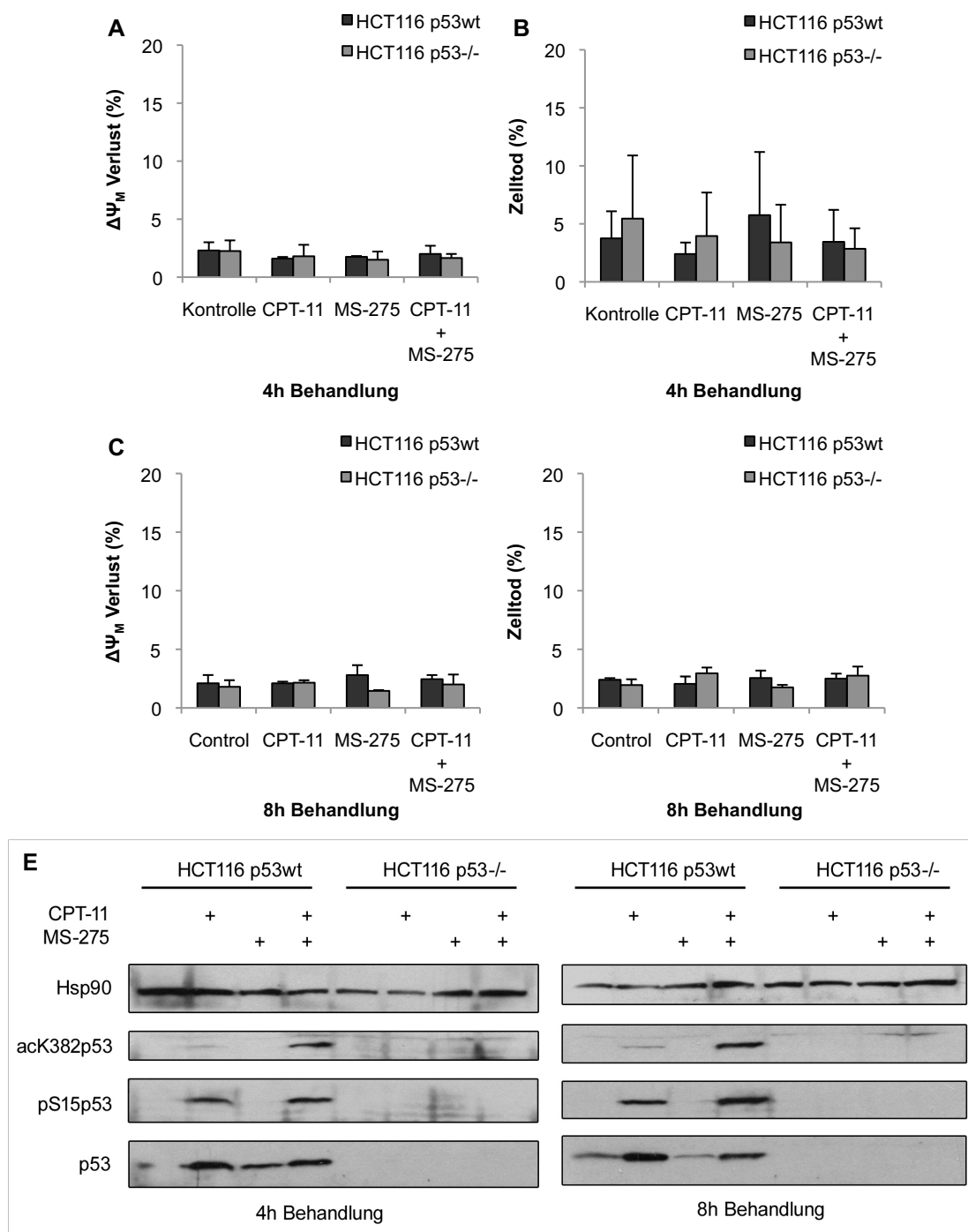
259. Terui T, Murakami K, Takimoto R, Takahashi M, Takada K, Murakami T, Minami S, Matsunaga T, Takayama T, Kato J, Niitsu Y, Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* (2003) **63**, No. 24, pp. 8948-8954
260. Teufel DP, Freund SM, Bycroft M, Fersht AR, Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104**, No. 17, pp. 7009-7014
261. Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC, Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* (1999) **276**, No. 5, pp. 1121-1131
262. Toledo F, Wahl GM, Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* (2006) **6**, No. 12, pp. 909-923
263. Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajerova A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM, WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* (2006) **281**, No. 13, pp. 8600-8606
264. Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP, Kwok TT, Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci* (2003) **73**, No. 16, pp. 2047-2058
265. Unger T, Juven-Gershon T, Moallem E, Berger M, Vogt Sionov R, Lozano G, Oren M, Haupt Y, Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J* (1999) **18**, No. 7, pp. 1805-1814
266. Valentin-Vega YA, Maclean KH, Tait-Mulder J, Milasta S, Steeves M, Dorsey FC, Cleveland JL, Green DR, Kastan MB, Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood* (2012) **119**, No. 6, pp. 1490-1500
267. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S, Adams JM, Roberts AW, Huang DC, The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* (2006) **10**, No. 5, pp. 389-399
268. Van Maerken T, Ferdinande L, Taideman J, Lambertz I, Yigit N, Vercruysse L, Rihani A, Michaelis M, Cinatl J Jr, Cuvelier CA, Marine JC, De Paepe A, Bracke M, Speleman F, Vandesompele J, Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst* (2009) **101**, No. 22, pp. 1562-1574
269. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB, Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* (1997) **91**, No. 5, pp. 627-637
270. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB, Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* (2001) **21**, No. 17, pp. 5899-5912
271. Vaseva AV, Moll UM, The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* (2009) **1787**, No. 5, pp. 414-420

272. Vaseva AV, Moll UM, Identification of p53 in mitochondria. *Methods Mol Biol* (2013) **962**, pp. 75-84
273. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C, Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* (2000) **243**, No. 1-2, pp. 167-190
274. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A, p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* (2003) **302**, No. 5647, pp. 1036-1038
275. von Stechow L, Ruiz-Aracama A, van de Water B, Peijnenburg A, Danen E, Lommen A, Identification of cisplatin-regulated metabolic pathways in pluripotent stem cells. *PLoS One* (2013) **8**, No. 10, e76476 [Epub]
276. Vousden KH, Prives C, Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* (2009) **137**, No. 3, pp. 413-431
277. Vousden KH, Ryan KM, p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* (2009) **9**, No. 10, 691-700
278. Wagner T, Brand P, Heinzel T, Krämer OH, Histone deacetylase 2 controls p53 and is a critical factor in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* (2014) **1846**, No. 2, pp. 524-538
279. Wallace DC, A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* (2005) **39**, pp. 359-407
280. Wallace KB, Starkov AA, Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2000) **40**, pp. 353-388
281. Wang X, The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* (2001) **15**, No. 22, pp. 2922-2933
282. Wang YH, Tsay YG, Tan BC, Lo WY, Lee SC, Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *J Biol Chem* (2003) **278**, No. 28, pp. 25568-25576
283. Warburg O, On the origin of cancer cells. *Science* (1956) **123**, pp. 309-314
284. Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD, ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* (1998) **19**, No. 2, pp. 175-178
285. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ, tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* (2000) **14**, No. 16, pp. 2060-2071
286. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* (2001) **292**, No. 5517, pp. 727-730
287. Willers H, Gheorghiu L, Liu Q, Efstathiou JA, Wirth LJ, Krause M, von Neubeck C, DNA Damage Response Assessments in Human Tumor Samples Provide Functional Biomarkers of Radiosensitivity. *Semin Radiat Oncol* (2015) **25**, No. 4, pp. 237-250
288. Wiseman A, Attardi G, Reversible tenfold reduction in mitochondrial DNA content of human cells treated with ethidium bromide. *Mol Gen Genet* (1978) **167**, No. 1, pp. 51-63

289. Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM, p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res* (2008) **18**, No. 7, pp. 733-744
290. Wolfson W, Epigenetic cancer therapies emerge out of the lab into the limelight. *Chem Biol* (2013) **20**, No. 4, pp. 455-456
291. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ, Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* (1997) **139**, No. 5, pp. 1281-1292
292. Wu C, Khan SA, Peng LJ, Lange AJ, Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Adv Enzyme Regul* (2006) **46**, pp. 72-88+
293. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA, Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2007) **292**, No. 1, C125-36 [Epub]
294. Wu W, Zhao S, Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* (2013) **45**, No. 1, pp. 18-26
295. Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM, Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* (2001) **20**, No. 2, pp. 240-251
296. Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T, Tani M, Iwahashi M, Noguchi K, Tamai M, Hotta T, Arai K, Chemosensitivity testing with highly purified fresh human tumour cells with the MTT colorimetric assay. *Eur J Cancer* (1991) **27**, No. 10, pp. 1258-1263
297. Yan S, Sorrell M, Berman Z, Functional interplay between ATM/ATR mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci* (2014) **71**, pp. 3951-3967
298. Yi J, Huang X, Yang Y, Zhu WG, Gu W, Luo J, Regulation of histone acetyltransferase TIP60 function by histone deacetylase 3. *J Biol Chem* (2014) **289**, No. 49, pp. 33878-33886
299. Yip KW, Reed JC, Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* (2008) **27**, No. 50, pp. 6398-6406
300. Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H, Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet* (2004) **49**, No. 3, pp. 134-140
301. Zacher Z, Marecek J, Maturo C, Gupta S, Stuart SD, Howell K, Schauble A, Lem L, Piramzadian A, Karnik S, Lee K, Rodriguez R, Shorr R, Bingham PM, Non-redox-active liponate derivatives disrupt cancer cell mitochondrial metabolism and are potent anticancer agents *in vivo*. *J Mol Med* (2011) **89**, pp. 1137-1148
302. Zhang J-G, Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Fariss MW, Mitochondrial Electron Transport Inhibitors Cause Lipid Peroxidation-Dependent and -Independent Cell Death: Protective Role of Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2001) **393**, No. 1, pp. 87-96
303. Zhang XP, Liu F, Cheng Z, Wang W, Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**, No. 30, pp. 12245-12250

- 304. Zhang XP, Liu F, Wang W, Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**, No. 22, pp. 8990-8995
- 305. Zhdanov AV, Waters AHC, Golubeva AV, Dmitriev RI, Papkovsky DB, Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochimica et Biophysica Acta* (2014) **1837**, pp. 51-62
- 306. Zhou S, Kachhap S, Singh KK, Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* (2003) **18**, No. 3, pp. 287-292
- 307. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL, Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* (2010) **327**, No. 5968, pp. 1000-1004
- 308. Zhao W, Kruse JP, Tang Y, Jung SY, Qin J, Gu W, Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* (2008) **451**, No. 7178, pp. 587-590
- 309. Zhao Y, Lu S, Wu L, Chai G, Wang H, Chen Y, Sun J, Yu Y, Zhou W, Zheng Q, Wu M, Otterson GA, Zhu WG, Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). *Mol Cell Biol* (2006) **26**, No. 7, pp. 2782-2790

8 Anhang

**Abbildung A.1: Kurze Behandlungszeiten mit Irinotecan und Entinostat in HCT116 Zellen**

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 4, bzw. 8 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) (A und C) und Zelltod (B und D) gemessen. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Durch Western Blot (E) wurde die post-translationale Modifikation von p53 nach 4 und 8 h Behandlung mit 10 μ M CPT-11 alleine und in Kombination mit 2 μ M MS-275 untersucht. HSP90 diente als Proteinladekontrolle.

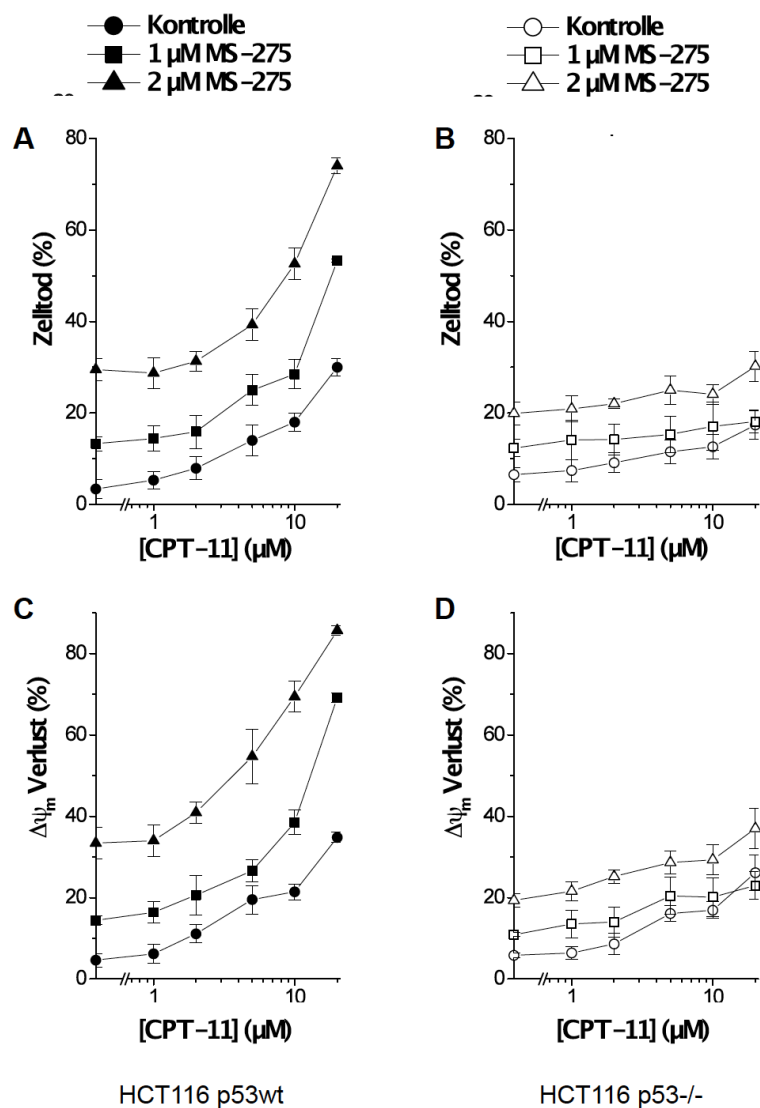


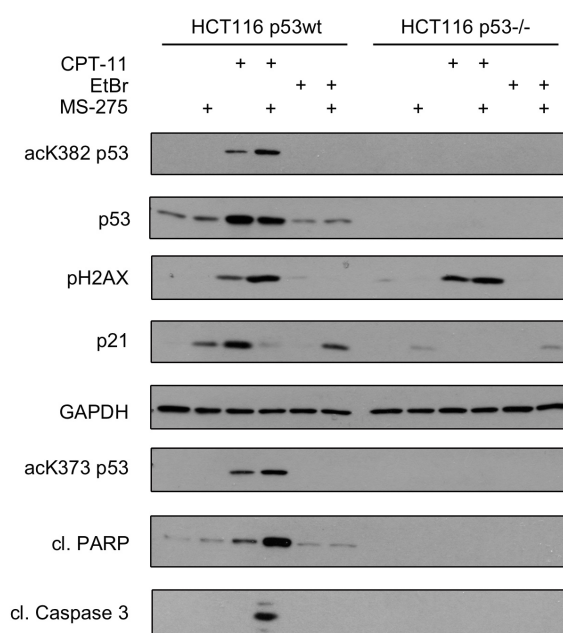
Abbildung A.2: Dosis-Wirkungskurven von Irinotecan kombiniert mit Entinostat in HCT116 Zellen

HCT116 p53wt (A und C) und HCT116 p53-/- (B und D) wurden mit 0, 1, 2, 5, 10 und 20 μM Irinotecan (CPT-11) in Kombination mit DMSO (Control) oder 1, bzw. 2 μM Entinostat (MS-275) für 48 h behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und Zelltod gemessen. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Jürgen Sonnemann durchgeführt.

Tabelle A.1: Berechnung der CI-Werte nach kombinierter Behandlung aus Irinotecan (CPT-11) und Entinostat (MS-275)

Die abgebildeten Werte wurden anhand der Resultate von Abb. A.2 (Anhang) nach der Chou-Talalay Methode (Chou und Talalay, 1984) mit CalcuSyn berechnet. Die Berechnungen wurden im Labor von Dr. Jürgen Sonnemann durchgeführt.

[MS-275] (μM)	[CPT-11] (μM)	HCT116 p53wt CI	HCT116 p53-/- CI
1	1	1.120	0.917
1	2	1.170	0.995
1	5	0.907	1.066
1	10	1.008	1.052
1	20	0.449	1.254
2	1	1.076	0.947
2	2	1.023	0.888
2	5	0.857	0.744
2	10	0.614	0.845
2	20	0.316	0.584

**Abbildung A.3: Vergleich der Effekte von Ethidiumbromid und Irinotecan**

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 24 h mit 10 μM Irinotecan (CPT-11), bzw. 50 ng/ml Ethidiumbromid (EtBr) alleine und in Kombination mit 2 μM Entinostat (MS-275) behandelt. Durch Western Blot wurden die post-translationale Modifikation von p53 und die Phosphorylierung von H2AX untersucht. Parallel wurden die Mengen an p21 und den Spaltprodukten von PARP1 und Caspase 3 untersucht. GAPDH diente als Proteinladekontrolle.

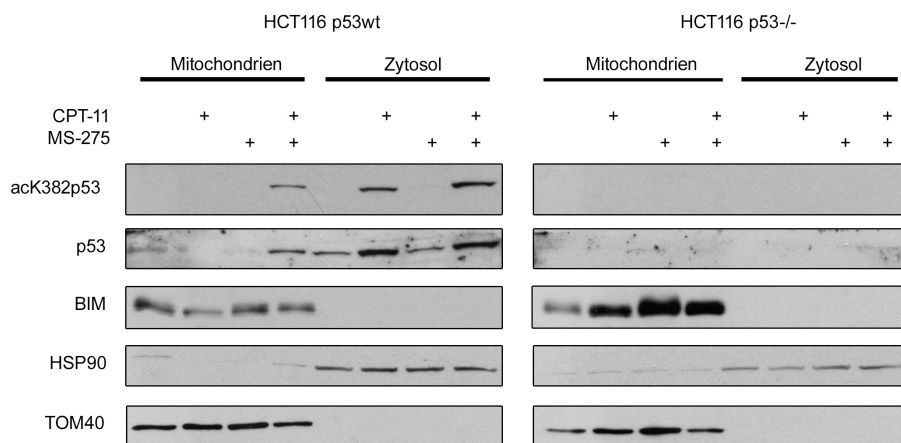


Abbildung A.2: Aktivierung von BIM und p53 nach Irinotecan und Entinostat Behandlung

HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Durch Zellfraktionierung und Western Blot wurde die zelluläre Lokalisation von p53 und BIM untersucht. HSP90 und TOM40 dienten als Proteinladekontrolle und als Marker für die mitochondriale, bzw. zytosolische Fraktion.

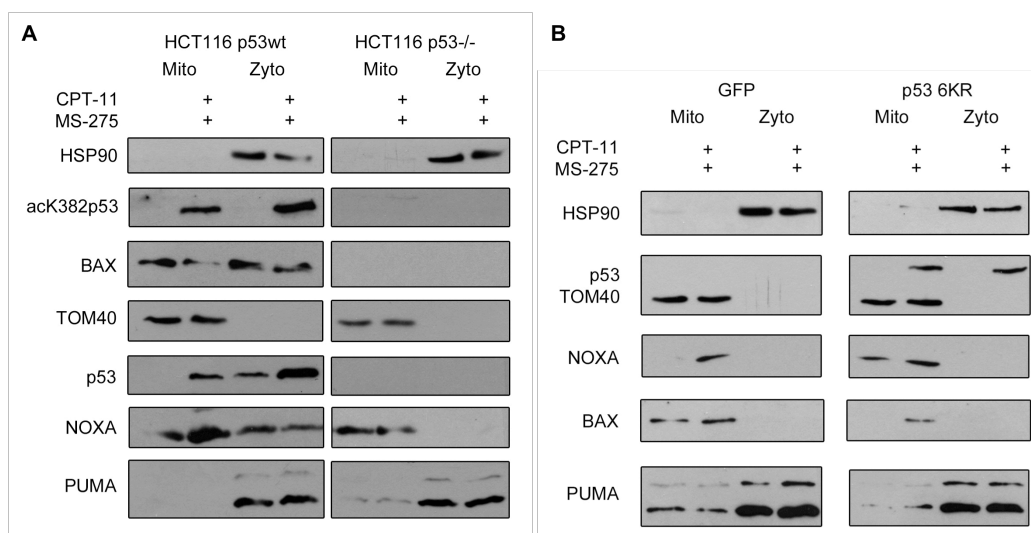


Abbildung A.3: Lokalisation der C-terminalen p53-Mutante im Vergleich zum Wildtyp

HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen (A) sowie stabil mit GFP oder p53 6KR transfizierte HCT116 p53^{-/-} (B) Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Nach Fraktionierung des Zelllysates in Mitochondrien und Zytosol wurde mittels Western Blot die Lokalisation und post-translationale Modifikation von p53 nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Expression und Lokalisation von BAX, PUMA und NOXA untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion und TOM40 wurden als Ladekontrolle für die mitochondriale Fraktion verwendet.

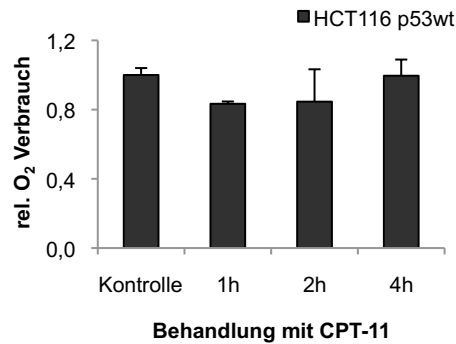


Abbildung A.6: Sauerstoffverbrauch nach kurzen Behandlungszeiten mit Irinotecan

HCT116 p53wt Zellen wurden 1, 2 oder 4 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde anschließend mittels einer Clark Elektrode gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle normiert.

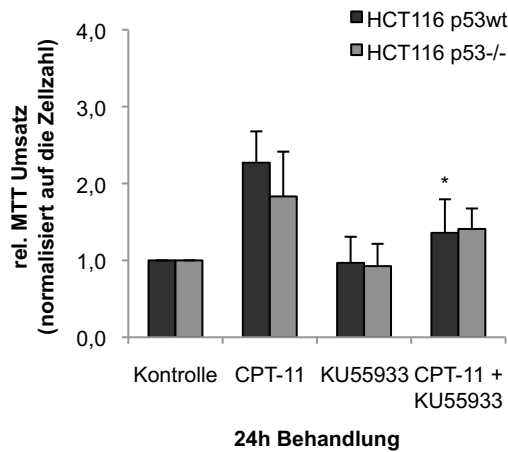
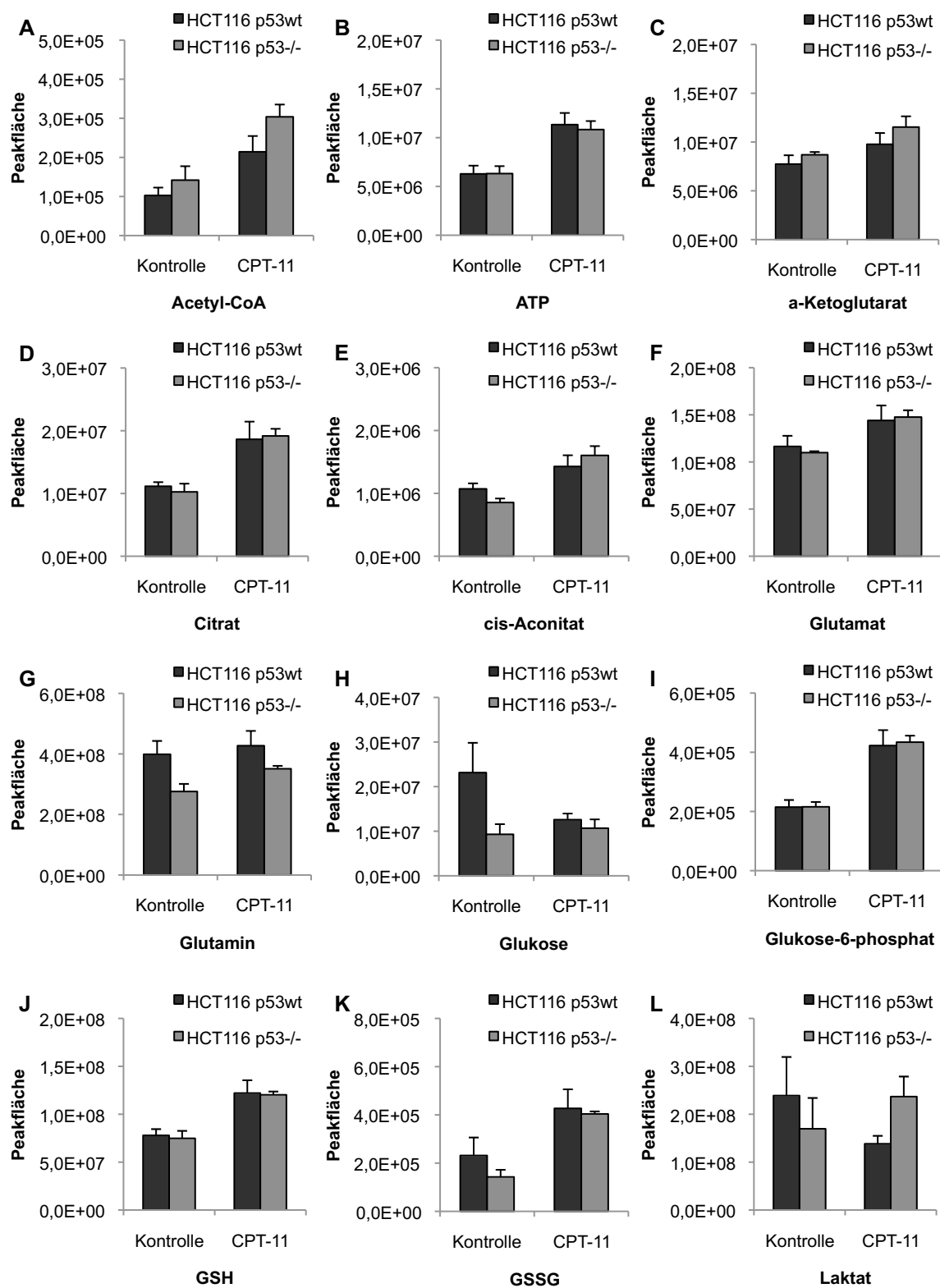


Abbildung A.7: ATM-Inhibitor KU55933 in Kombination mit Irinotecan

HCT116 p53wt und p53^{-/-} Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 10 μ M KU55933 behandelt. Zu jeder Behandlung wurden in parallelen Experimenten die Zellzahl (nicht gezeigt) und der MTT Umsatz (nicht gezeigt) bestimmt. Anschließend wurde daraus der MTT Umsatz pro Zellzahl ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels *T*-Test berechnet (*p*-Wert: * > 0,05; ** > 0,01; *** > 0,001) und sind auf die jeweilige CPT-11-Einzelbehandlung bezogen.



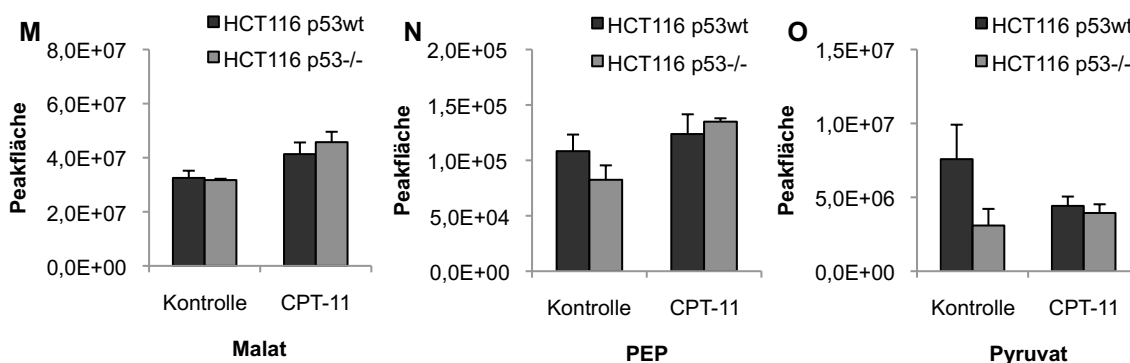


Abbildung A.8: Veränderung intrazellulärer Stoffwechselzwischenprodukte nach Irinotecan-Behandlung

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Massenspektroskopie die Mengen verschiedener intrazellulärer Metabolite bestimmt. Die Werte wurden nachträglich nicht normalisiert, da alle Lysate vor der Messung auf 2×10^6 Zellen pro ml angeglichen wurden. Die integrierte Peakfläche gibt die Menge jedes Metaboliten an. Die Abb. zeigen die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten.

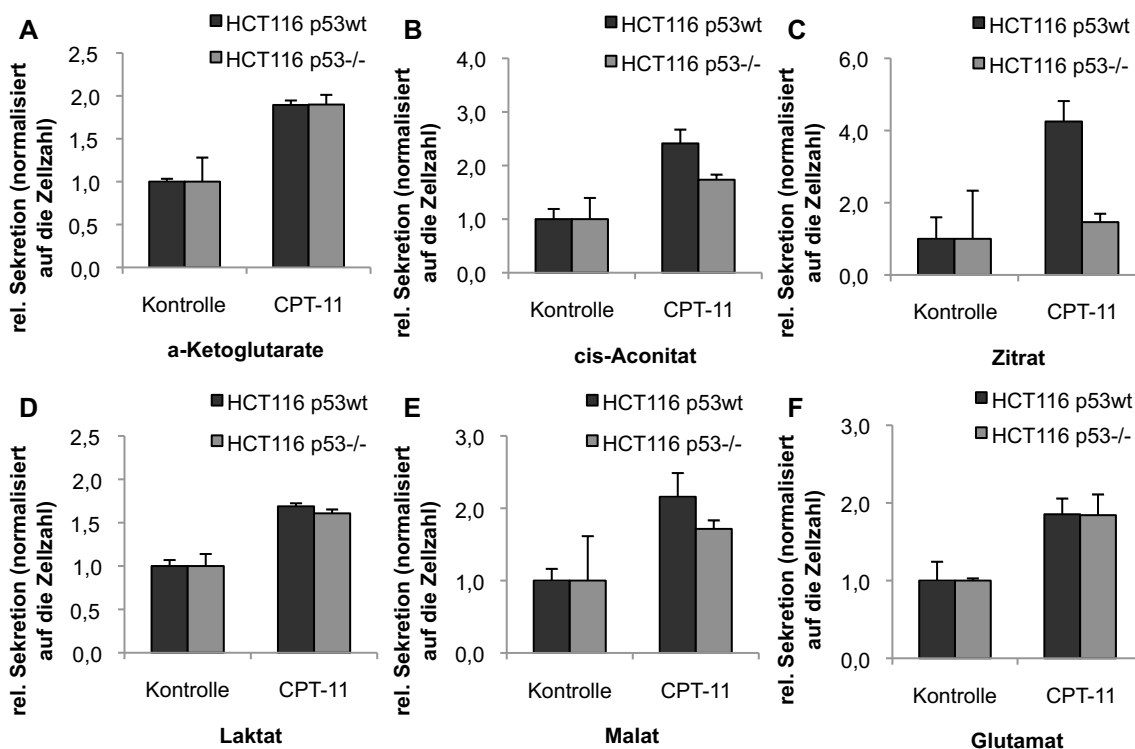


Abbildung A.9: Veränderte Sekretion von Metaboliten nach Irinotecan-Behandlung

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Anschließend wurden mittels Massenspektroskopie die Sekretion verschiedener Metabolite in das umgebende Medium bestimmt. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle und Zellzahl nach 24 h Behandlung normalisiert und zeigen den Unterschied zum ursprünglich eingesetzten DMEM. Die Abb. zeigen die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten.

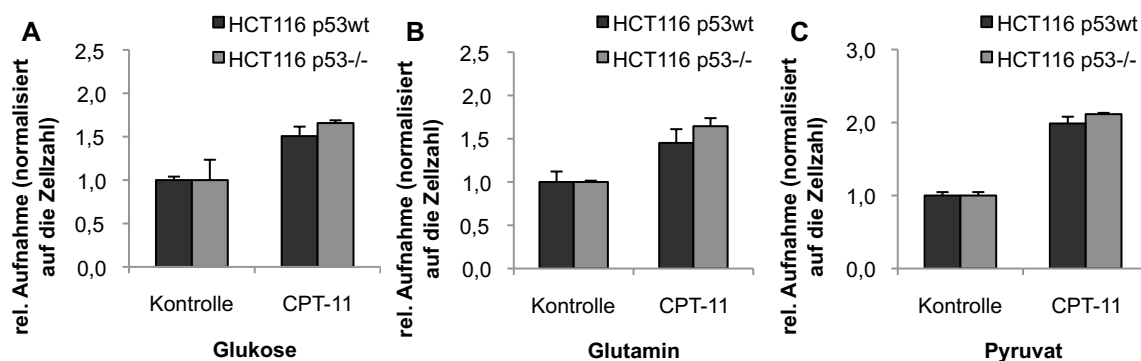


Abbildung A.10: Gesteigerte Aufnahme verschiedener Nährstoffe nach Irinotecan-Behandlung
HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden 24 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Anschließend wurden mittels Massenspektroskopie die Aufnahme verschiedener Metabolite aus dem umgebenden Medium bestimmt. Die Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle und Zellzahl nach 24 h Behandlung normalisiert und zeigen den Unterschied zum ursprünglich eingesetzten DMEM. Die Abb. zeigen die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten.

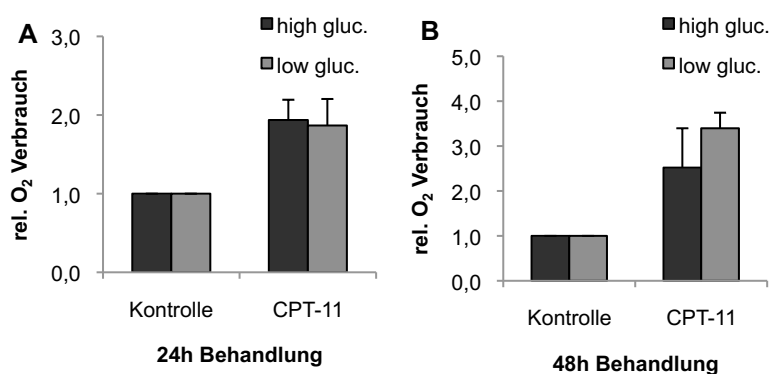


Abbildung A.11: Sauerstoffverbrauch nach unterschiedlicher Glukoseverfügbarkeit
HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden in DMEM mit niedrigen (*low gluc.*; 1 g/l) und hohen (*high gluc.*; 5 g/l) Glukosemengen 24, bzw. 48 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) behandelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde anschließend mittels einer Clark Elektrode gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle normiert. Die Abb. A zeigt die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

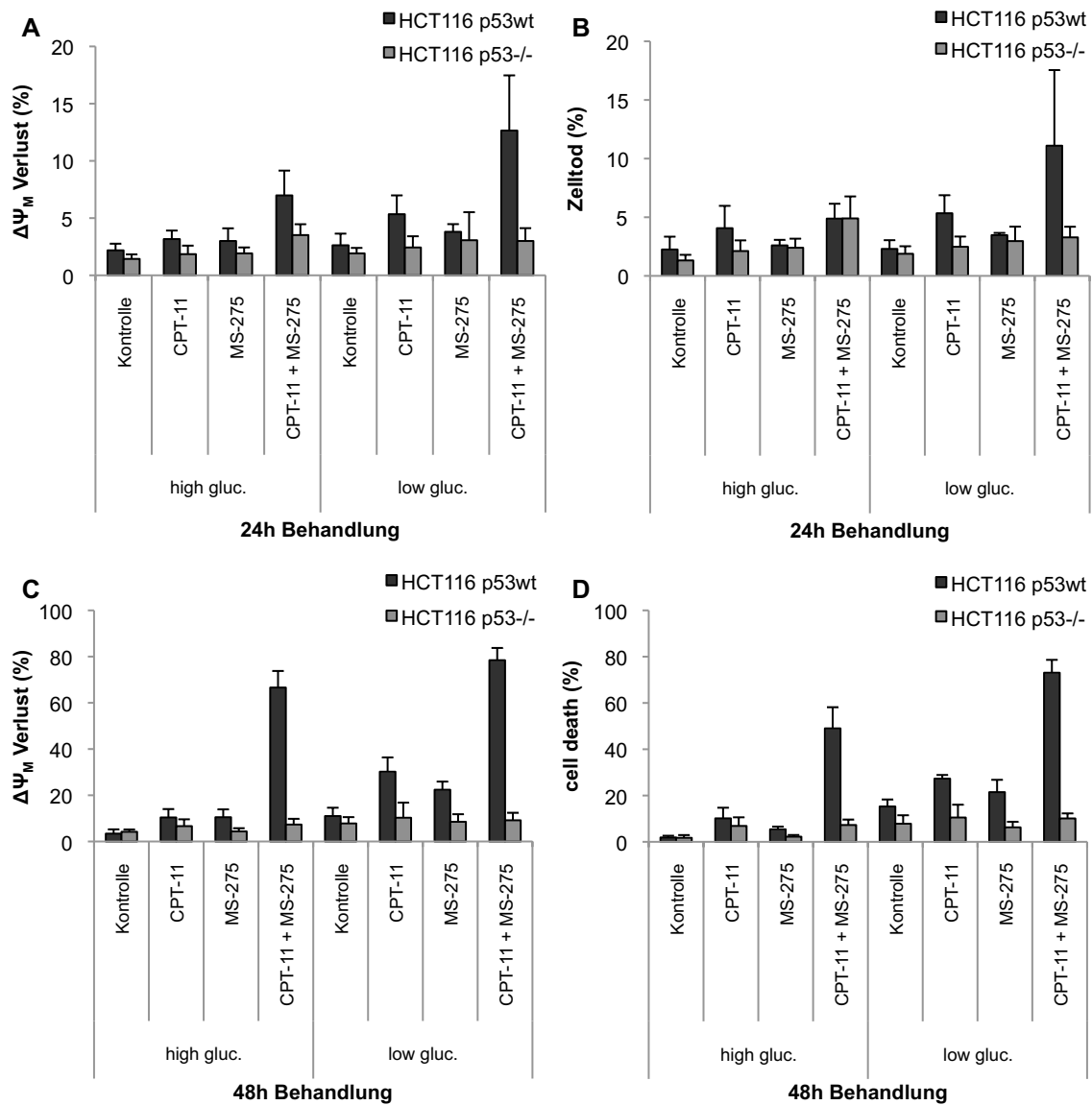


Abbildung A.12: Rolle der Glukoseverfügbarkeit während der Behandlung mit Irinotecan und Entinostat

HCT116 p53wt und p53-/- Zellen wurden in DMEM mit niedrigen (*low gluc.*; 1 g/l) und hohen (*high gluc.*; 5 g/l) Glukosemengen 24, bzw. 48 h mit 10 μ M Irinotecan (CPT-11) alleine und in Kombination mit 2 μ M Entinostat (MS-275) behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) (A und C) und Zelltod (B und D) gemessen. Die Abbildungen A-D zeigen jeweils die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten. Die Daten der Abbildung 5.20 sind auch Teil dieser Abbildung.

Lebenslauf mit Liste der Veröffentlichungen

Akademische Titel: Bachelor of Science (B.Sc.) Biochemie

Master of Science (M.Sc.) Biochemie und molekulare Biologie

Geburtsdatum: 13.04.1986

Geburtsort: Lichtenfels

Ausbildung:

- 1992-1996 Grundschule in Lichtenfels
- 1996-2005 Meranier-Gymnasium in Lichtenfels
- 2005-2006 Zivildienst im Bayerischen roten Kreuz in Lichtenfels
- 2006-2009 B.Sc. Biochemie an der Universität Bayreuth
- 2009-2011 M.Sc. Biochemie und molekulare Biologie an der Universität Bayreuth
- Seit Dezember 2011 Doktorand der Friedrich-Schiller-Universität im Lehrstuhl Biochemie und Biophysik unter der Betreuung von Prof. Dr. Thorsten Heinzel und Prof. Dr. Oliver H. Krämer
- Januar-April 2014 Auslandspraktikum im Labor von Prof. Dr. Karen Vousden, im *Beatson Institute for Cancer Research* in Glasgow, Schottland
- Seit August 2015 wissenschaftlicher Mitarbeiter des Leibniz-Instituts für Altersforschung (Fritz-Lipmann-Institut) in Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zhao-Qi Wang

Fortbildungen:

- Gute wissenschaftliche Praxis - und der Umgang mit Konflikten im Forschungsalltag
- *English Conversation Workshop*
- Literaturverwaltung mit EndNote
- Scientific Presentations
- *Leadership Skills*
- BWL kompakt
- Werbung in eigener Sache – die Bewerbung
- *Scientific writing and publishing for natural scientists – the basics*

Auszeichnungen:

Preis für das beste Poster beim *5th Postgraduate Symposium on Cancer Research* in Dornburg

Stipendien:

- *Travel grant* der Böhlinger Ingelheim Fonds für den Auslandsaufenthalts in Glasgow
- Promotionsabschlusssstipendium der Richard-Winter-Stiftung

Veröffentlichungen:

Sonnemann J, **Marx C**, Becker S, Wittig S, Palani CD, Krämer OH, Beck JF, p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer* (2014) **110**, No. 3, pp. 656-667

Rauch A, Hennig D, Schäfer C, Wirth M, **Marx C**, Heinzel T, Schneider G, Krämer OH, Survivin and YM155: how faithful is the liaison? *Biochim Biophys Acta* (2014) **1845**, No. 2, pp. 202-220

Kreß O, Gnida M, Pelzmann AM, **Marx C**, Meyer-Klaucke W, Meyer O Reversible inactivation of CO dehydrogenase with thiol compounds. *Biochem Biophys Res Commun* (2014) **447**, No. 3, pp. 413-418

Sonnemann J, Grauel D, Blümel L, Hentschel J, **Marx C**, Blumrich A, Focke K, Becker S, Wittig S, Schinkel S, Krämer OH, Beck JF, RETRA exerts anticancer activity in Ewing's sarcoma cells independent of their TP53 status. *Eur J Cancer* (2015) **51**, No. 7, pp. 841-851

Deschoemaeker S, Di Conza G, Lilla S, Martín-Pérez R, Mennerich D, Boon L, Hendrikx S, Maddocks OD, **Marx C**, Radhakrishnan P, Prenen H, Schneider M, Myllyharju J, Kietzmann T, Vousden KH, Zanivan S, Mazzone M, PHD1 regulates p53-mediated colorectal cancer chemoresistance. *EMBO Mol Med* (2015) **7**, pp. 1350-1365

Blümel L, **Marx C**, Kühne M, Sonnemann J, Assessment of HDACi-induced cytotoxicity. (in Vorbereitung)

Des Weiteren soll bald ein Teil der vorliegenden Arbeit publiziert werden:

Marx C, Sonnemann J, Blümel L, Lilla S, Westermann M, Vousden KH, Maddocks OD, Thierbach R, Löper N, Poburski D, Heinzel T, Krämer OH, C-terminal acetylation of p53 modulates its adaptive stress-responses. (in Vorbereitung)

Tagungsbeiträge:

Marx C, Thierbach R, Wünsch D, Krämer OH, Heinzel T, p53 independent metabolic changes in HCT116 colon cancer cell lines after chemotherapy. Posterbeitrag, 5th Postgraduate Symposium on Cancer Research, 27. April 2013, Altes Schloss Dornburg, Deutschland

Marx C, Thierbach R, Wünsch D, Heinzel T, Krämer OH, Metabolic changes in HCT116 colon cancer cell lines after chemotherapy. Posterbeitrag, Cancer and Metabolism 2013, 24.-25. Juni 2013, De Rode Hoed, Amsterdam, Niederlande

Marx C, Krämer OH, Metabolic adaptations after DNA damage. Posterbeitrag, 13th Biennial Meeting of the DGDR in Mainz: "DNA repair, DDR and genotoxic endpoints", 08.-12. September 2014, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland

Danksagung

Ich möchte mich am Ende meiner Promotion noch einmal herzlich bei allen bedanken, die für das Gelingen der Arbeit mit verantwortlich waren und mich auf meinem Weg unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein Dank den Professoren Oliver H. Krämer und Thorsten Heinzel. Mein Doktorvater Prof. Dr. Oliver H. Krämer hat mich von Beginn an gut betreut und unterstützt. Durch seine Anregungen und Beiträge konnte ich gezielt an dem Projekt arbeiten und zügig Erfolge erzielen.

Prof. Dr. Thorsten Heinzel hat mich während meiner Zeit als Doktorand ebenfalls immer geholfen und wichtige Beiträge zu den laufenden Projekten mit eingebracht. Gerade am Ende meiner Promotion hat er zusammen mit den beiden Professoren Dr. Reinhard Wetzker und Dr. Zhao-Qi Wang, mich noch einmal sehr unterstützt und mir bei dem erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit geholfen. Zusätzlich hat er alle nötigen Mittel für meine Arbeit zur Verfügung gestellt und mein Vorankommen damit ermöglicht.

Den beiden Mitgliedern meines *PhD thesis committees*, Prof. Dr. Zhao-Qi Wang und PD Dr. Ignacio Rubio, möchte ich meinen herzlichen Dank für ihre fachliche Hilfe und ihren Beiträgen zu meiner Arbeit, aussprechen.

Der DFG und der *research training group* RTG1715 möchte ich für die Finanzierung meines Projektes danken. In dem Zusammenhang bedanke ich mich ebenfalls sehr herzlich bei dem Koordinator des RTGs, Prof. Dr. Reinhard Wetzker, der meine Promotion erst ermöglicht hat.

Zusätzlich wurde ich durch ein Reisestipendium der Boehringer Ingelheim Fonds und ein Promotionsabschlussstipendium der Richard-Winter-Stiftung gefördert. Beiden Institutionen möchte ich vielmals danken, dass sie mir einerseits den dreimonatigen Auslandsaufenthalt in Glasgow ermöglichten und andererseits mir geholfen haben die Finanzierungslücke vor Abgabe meiner Dissertation zu schließen.

Des Weiteren möchte ich Sigrid Reichardt und Sabine Scheiding für die praktische Hilfe und das hervorragende Arbeitsklima im Labor danken. Ein Dankeschön verdienen auch alle Mitglieder der AG Krämer (Mainz und Jena), AG Heinzel, AG Kosan sowie AG Liebmann für kleine und große Hilfestellungen sowie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Dr. Jürgen Sonnemann, PD Dr. Martin Westermann und Dr. René Thierbach möchte ich für die stets freundliche Zusammenarbeit und deren Hilfe danken. Die Kooperationen erbrachten wichtige Daten für meine Arbeit und für geplante Publikationen.

Bei Prof. Dr. Karen H. Vousden möchte ich mich bedanken, dass sie mir so unkompliziert einen Platz in ihrem Labor für meinen Auslandsaufenthalt zur Verfügung gestellt hat und großzügigerweise alle dort entstandenen Kosten übernommen hat. Dr. Oliver D. Maddocks möchte ich für seine Betreuung vor Ort und auch noch nach dem Aufenthalt bedanken. Darüber hinaus gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie sowie meiner Freundin bedanken, die mich jederzeit und in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Ich habe die vorliegende Dissertation selbst angefertigt, keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes haben mir keine weiteren Personen geholfen, sofern dies von mir in der Arbeit nicht als Kooperation gekennzeichnet wurde. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Des Weiteren wurde die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung ist nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden.

.....
Ort, Datum

.....
Christian Marx